

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİNİR REJENERASYONUNDA ŞARTLANDIRMA HASARI ETKİSİ VE
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Elif KAVAL OĞUZ
DANIŞMAN: Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

VAN - 2009

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİNİR REJENERASYONUNDA ŞARTLANDIRMA HASARI ETKİSİ VE
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Elif KAVAL OĞUZ

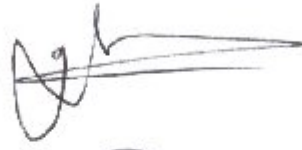
VAN - 2009

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK danışmanlığında, Elif KAVAL OĞUZ tarafından hazırlanan “**Sinir Rejenerasyonunda Şartlandırma Hasarı Etkisi ve Mekanizmasının Araştırılması**” isimli bu çalışma 13/03/ 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: **Doç.Dr. Gürkan ÖZTÜRK**

İmza:



Üye: **Doç.Dr. Ender ERDOĞAN**

İmza:



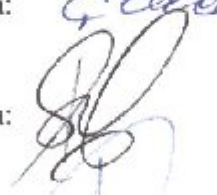
Üye: **Doç.Dr. İsmail ÇELİK**

İmza:



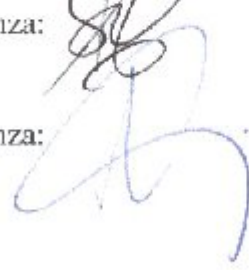
Üye: **Doç.Dr. Işıl AKSAN KURNAZ**

İmza:



Üye: **Yrd.Doç.Dr. Nurettin CENGİZ**

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun**27**.... /...**03**.... /**2009**.Gün ve **2009/10/27** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Nahit AKTAŞ

Enstitü Müdürü



ÖZET

SİNİR REJENERASYONUNDA ŞARTLANDIRMA HASARI ETKİSİ VE MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

KAVAL OĞUZ, Elif

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Mart 2009, 187 sayfa

Periferik bir sinir bir kez hasarlandıktan sonra, aynı sinirin ikinci kez hasarlanmasıyla akson rejenerasyonunda bir artış meydana gelir. Bu artışa sebep olan öncü hasar ‘şartlandırma hasarı’ adını alır. Rejenerasyon kapasitesini arttırdığı bilinen bu etkinin oluşmasında sitokin ailesi üyesi olan lösemi inhibe edici faktörün (LIF) de rol oynadığı bilinmektedir. Sağlam sinir hücrelerinde henüz tespit edilememiş olan LIF mRNA’sının gen ifadesi, aksotomiye takiben hasar bölgesindeki nöron dışı hücrelerde artar ve arka kök ganglion hücrelerine 24 saat içinde retrograd olarak taşınır. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda bu etkinin araştırılması için etkin bir in vitro model geliştirilememiştir. Bu çalışma, nöronların tamamen in vitro ortamda şartlanmasını sağlayacak bir model geliştirerek fare arka kök ganglion hücrelerinde şartlandırma hasarı etkisiyle LIF’in ilişkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada fare arka kök ganglionları ayrıştırılarak hücre kültürleri yapıldı ve bu hücrelerin in vitro ortamda şartlanmaları sağlandı. Bu yöntemin etkinliği bir seri deneyle test edildi. Ayrıca şartlanma hasarı etkisiyle akson uzamasının değişmesi, kontrol grubu nöronlarla in vitro şartlanan nöronların akson rejenerasyon hızları ölçülerek araştırıldı. Şartlandırma hasarı etkisiyle LIF’in ilişkisi ise siyatik sinir kesisi ve faktör uygulaması sonrası fare arka kök ganglion kesitlerinde ve primer duyu nöron kültürlerinde LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapılarak araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda; in vitro olarak şartlanan nöronların kontrol kültürlerindeki göre çok daha hızlı bir akson rejenerasyonu gösterdiği ve geliştirilen in vitro şartlanma modelinin şartlandırma hasarı etkisinin aydınlatılmasında oldukça

etkin bir teknik olduğu gösterildi. Bu alışma literatürde ilk defa olarak arka kök ganglion nöronlarında periferik sinir hasarına bağlı artmış bir LIF ve LIF reseptör üretimini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Şartlandırma hasarı, Arka kök ganglionu, Lösemi inhibe edici faktör

ABSTRACT

SEARCHING OF CONDITIONING LESION EFFECT AND ITS MECHANISM IN NERVE REGENERATION

KAVAL OĞUZ, Elif

PhD Thesis, Biology Science

Supervisor: Asoss. Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

March 2009, 187 pages

There is an increased axonal regeneration after a peripheral nerve is injured if it sustains an earlier prior injury. The first injury causing this is called a conditioning lesion. It is known that leukemia inhibitory factor (LIF), a member of cytokine family, plays role in this effect that increases the regenerative capacity. The expression of LIF mRNA, which has not been demonstrated in intact neurons, is upregulated in non-neuronal cells at the site of injury and retrogradely transported to the dorsal root ganglion neurons within 24 hours following an injury. No effective in vitro model has been developed so far for investigation of this effect. This study has been conducted to develop a model to condition neurons in vitro and the relation of LIF with conditioning lesion effect in mouse dorsal root ganglion neurons is searched.

In this study, cell cultures were set up by dissociation of mouse dorsal root ganglia and the cells were incubated to provide in vitro conditioning. The activity of the method is tested with a series of experiments. Besides that the change in the axonal growth due to conditioning effect was quantified by comparing axonal regeneration rates of neurons conditioned in vitro to those of control group neurons. The relation of LIF with conditioning lesion effect is investigated by LIF and LIF receptor immunohistochemistry that was performed in the sections of mouse dorsal root ganglia and cultures of primary sensory neurons in control preparations, after sciatic nerve cut or application of factors.

In conclusion, it has been shown that in vitro conditioned neurons had a higher rate of axonal regeneration and the in vitro conditioning model developed is a very

effective technique to elucidate the mechanism of conditioning effect. This study has shown, for the first time in the literature, an upregulated LIF and LIF receptor expression in dorsal root ganglion neurons due to peripheral nerve injury.

Keywords: Conditioning lesion, Dorsal root ganglion, Leukemia inhibitory factor.

ÖN SÖZ

Sinir sistemi, canlının iç ve dış ortamında sürekli olarak meydana gelen değişiklikleri izleyerek bunlara cevap vermesini sağlayan, organ ve organ sistemlerinin kusursuz bir şekilde çalışmasını kontrol eden sistemdir. Periferik (çevresel) ve merkezi olmak üzere iki kısma ayrılan sinir sistemi milyarlarca sinir hücresinden oluşur. Bir canlıda herhangi bir hasarın ardından meydana gelen doku ve hücre kaybının giderilerek yeni dokunun oluşması ‘rejenerasyon’ adını alır. Bu rejenerasyon merkezi sinir sisteminde yok denecek kadar az iken, periferik sinir sisteminde tam iyileşmeyi sağlayacak kadar etkili olabilir. Sinir sisteminde gerçekleşen rejenerasyon sonucunda nörogenez yani yeni sinir hücresi oluşumu neredeyse hiç gözlenmezken hasar gören aksonların tekrar uzayarak hedef doku ve hücrelerle bağlantıları yeniden sağlanabilir.

Nöronlar farklı şekillerde herhangi bir hasara uğradıklarında genellikle sonraki aksonal rejenerasyon için hazırlanırlar. Eğer bu nöronların aksonları ilk “şartlandırma hasarının (conditioning lesion)” genellikle proksimalinde ikinci bir “test hasarına” daha maruz kalırlarsa şartlandırma hasarına uğramayan nöronlarla karşılaştırıldığında daha fazla rejenere oldukları gözlenir. Bu artan rejenerasyon fenomeni, “şartlandırma hasarı etkisi” olarak adlandırılır. Şartlandırma etkisi mekanizması tam olarak açıklanamamış olup, hala üzerinde çalışan pek çok araştırmacı bulunmaktadır. Bu etkinin hücresel ve moleküler mekanizmasının anlaşılması, hem periferik hem de merkezi sinir sisteminin rejenerasyon kapasitesinin artırılmasında yeni müdahale tekniklerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Bu etkiyi araştırmak amacıyla bugüne kadar yapılan çalışmalar, periferik bir sinire in vivo ortamda uygulanan şartlandırma hasarının ardından yapılan in vitro araştırmaları içermektedir. Bu çalışmada ise yeni ve tamamen in vitro koşullarda şartlandırma hasarı çalışması gerçekleştirildi. İlk kez başarıyla gerçekleştirilen bu in vitro şartlandırma modeli ile in vitro ortama müdahale etme şansının yanı sıra şartlanma sonrasında nöronların rejenerasyon davranışları da gözlenebildi. Bu gözlemler sonucunda yine ilk kez bu çalışmada yapılan rejenerasyon hız ve aktivite analizleriyle, bu etkinin mekanizması etkin bir şekilde değerlendirilebildi. Tez çalışmamda; her konuda güvenini, desteğini ve bilgisini esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Gürkan

ÖZTÜRK'e, beni bu alanda çalışmaya teşvik eden sevgili hocam Prof. Dr. Güler ÜNAL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Nurettin CENGİZ'e, Doç. Dr. Ender ERDOĞAN'a, laboratuvar çalışmalarını eksilmeyen neşeleriyle eğlenceli hale getiren arkadaşlarım Elçin YENİDÜNYA'ya, Neşe AYŞİT'e, her zaman destek, güven ve sabırlarını eksik etmeyen aileme, eşim Ahmet Regaib OĞUZ'a ve biricik kızım Berra Zeynep'e teşekkürlerimi sunarım.

Elif KAVAL OĞUZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Nöron (Sinir Hücresi)	3
2.2. Arka Kök Ganglionları	4
2.3. Sinir Rejenerasyonu	4
2.3.1. Periferik sinir hasarı sonrasında duyu nöronlarında meydana gelen değişiklikler	5
2.3.2. Nöropeptid ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	6
2.3.3. Nörotrofik faktörlerin sinir rejenerasyonuna etkileri	7
2.3.3.1. Nörotrofinler ve reseptörleri	8
2.3.3.1.1. Sinir büyüme faktörü (NGF)	10
2.3.3.1.2. Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)	11
2.3.3.1.3. Nörotrofin 3 (NT3)	12
2.3.3.1.4. Nörotrofin 4/5 (NT 4/5)	13
2.3.3.2. Sitokin ailesi	14
2.3.3.2.1. Hasarlanan sinir sisteminde sitokinler	16
2.3.3.2.2. Nörotrofik ve rejeneratif aktivitelerde sitokinler	16
2.3.3.3. Glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF)	18
2.3.3.4. Fibroblast büyüme faktörleri (FGF)	19
2.3.4. Sinir rejenerasyonunda şartlandırma hasarı etkisi	20

3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Deney hayvanı	26
3.1.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar	28
3.2.1.1. Diseksiyon vasatı	28
3.2.1.2. Kültür vasatı	28
3.2.2. Fareden arka kök ganglionlarının çıkarılması	28
3.2.3. Hücre kültürü	28
3.2.4. Şartlandırma modelleri	31
3.2.4.1. İn vivo şartlandırma deneyleri	31
3.2.4.2. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültür deneyleri	32
3.2.4.3. İn vitro şartlandırma deneyleri	32
3.2.4.4. İn vitro şartlandırma modelinin etkinliğinin araştırılması	33
3.2.4.4.1. Calcein ve propidyum iyodür deneyi	33
3.2.4.4.2. Lucifer sarısı deneyi	33
3.2.4.4.3. Dekstran deneyleri	33
3.2.4.5. Tüm arka kök ganglionlarının ayrıştırılmadan in vitro şartlandırılması	34
3.2.5. Normal (şartlanmamış) siyatik parçalarıyla ko-kültür deneyleri	34
3.2.6. Aksotomi (akson kesisi) modelleri	34
3.2.6.1. PALM Mikrolaser sistemi	35
3.2.6.2. Şartlanan hücrelerin tripsinle ikinci aksotomi deneyleri	36
3.2.7. LIF'in şartlandırma etkisindeki rolünün araştırılması	36
3.2.7.1. Kontrol deneyleri	36
3.2.7.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri	36
3.2.7.3. Şartsız hücre kültürü ve aksotomi deneyleri	36
3.2.7.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri	36
3.2.7.5. LIF inhibisyon deneyleri	37
3.2.7.5.1. Kontrol deneyleri	37
3.2.7.5.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri	37

3.2.7.5.3. İn vitro şartlı hücrelere sürekli α -LIF uygulaması deneyleri	37
3.2.7.5.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri	37
3.2.7.6. LIF ile NGF arasındaki karşılıklı ilişkinin araştırılması deneyleri	37
3.2.8. İmmunohistokimya deneyleri	39
3.2.8.1. Tespit işlemi	39
3.2.8.2. Primer antikor uygulaması	39
3.2.8.3. Sekonder antikor uygulaması	40
3.2.8.4. İmmunohistokimya deney tanımları	40
3.2.8.4.1. Arka kök ganglion kesitlerinde yapılan immunohistokimya deneyleri	40
3.2.6.4.2. Hücre kültürleriyle yapılan immunohistokimya deneyleri	40
3.2.9. Mikroskopik görüntüleme ve görüntü analizleri	41
3.2.9.1. Zaman aralıklı mikroskopi (Time Lapse) ile görüntüleme	41
3.2.9.2. Görüntü analizleri	42
3.2.9.3. Laser taramalı konfokal mikroskopta immunohistokimyasal preparatların görüntülenmesi	43
3.2.9.4. Floresan görüntü analizleri	44
3.2.10. İstatistiksel analizler	44
4. BULGULAR	45
4.1. Rejenerasyon Hız ve Aktivitesinin Zamansal Analizi	45
4.1.1. Kontrol grubu	45
4.1.2. İn vivo şartlanma deneyi	47
4.1.3. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültür deneyi	49
4.1.4. İn vitro şartlandırma deneyi	51
4.1.4.1. İn vitro şartlandırma deney modelinin etkinliğinin araştırılması	53
4.1.4.1.1. Calcein ve propidyum iyodür deneyi	53
4.1.4.1.2. Lucifer sarısı deneyi	55

4.1.4.1.3. Floresan dekstran deneyleri	55
4.1.5. Tüm arka kök ganglionlarının (AKG) ayrıştırılmadan in vitro şartlandırılması deneyi	57
4.1.6. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla yapılan kokültür deneyi	59
4.1.7. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların ikinci aksotomi deneyi	61
4.1.8. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların ikinci aksotomi deneyi	63
4.1.9. İn vitro şartlanan nöronların ikinci aksotomi deneyi	65
4.1.10. Şartlanan hücrelerin tripsinle ikinci aksotomi deneyi	67
4.1.11. LIF'in şartlandırma etkisindeki rolünün araştırılması	69
4.1.11.1. Kontrol deneyi	69
4.1.11.2. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyi	71
4.1.11.3. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyi	73
4.1.11.4. Şartlanmamış hücre kültürü ve aksotomi deneyi	75
4.1.12. LIF inhibisyon deneyleri	77
4.1.12.1 Kontrol deneyi	77
4.1.12.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyi	79
4.1.12.3. İn vitro şartlı hücrelere sürekli α -LIF uygulaması deneyi	81
4.1.12.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyi	83
4.2. Şartlandırma Hasarı Deney Gruplarının Karşılaştırmalı Analizleri	85
4.3. Bazı Deney Gruplarının Alan, Akson Çapı ve Dal Sayısının Analizi	134
4.4. LIF ve LIF Reseptörünün İmmunohistokimyasal Analizi	138
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	153
5.1. Tez Çalışmasında Geliştirilen ve Uygulanan Yeni Tekniklerin Etkinlikleri	153
5.1.1. İn vitro şartlandırma modeli	153
5.1.2. Akson rejenerasyonunun ve şartlandırma etkisinin ayrıntılı zaman analizi	155
5.1.3. Periferik sinir - nöron ko-kültürleri	156
5.2. İn vivo Şartlanma Etkisi Sanıldığı Kadar Güçlü Değil	156

5.3. Nöronlardaki İnstrinsik Değişiklikler Şartlandırma Etkisi İçin Yeterli Olabilir	157
5.4. Periferik Sinir Salgıları Şartlandırmaya Katkıda Bulunuyor	157
5.5. İkinci Aksotomi (Test hasarı) Deneyleri	158
5.6. LIF Şartlandırma Etkisi İçin Çok Önemli Bir Faktör	159
5.7. LIF Aksotomi Sonrası Nöronlarda Sentezleniyor	160
5.8. LIF Akson Rejenerasyonunu Destekliyor	162
5.9. Sonuç ve Yorum	163
KAYNAKLAR	165
ÖZGEÇMİŞ	187

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Aksotomi sonrasında nöronlarda gözlenen nöropeptid ekspresyon değişiklikleri.	7
Çizelge 3.1. Sarf malzeme listesi	26
Çizelge 3.2. Deney modelleri	38
Çizelge 3.3. İmmunohistokimyasal deney modelleri	41
Çizelge 4.1. İkinci aksotomisi laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile yapılan deney gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.	133
Çizelge 4.2. Nöron alan büyüklükleri karşılaştırılan deney grupları.	134
Çizelge 4.3. Akson çapları karşılaştırılan deney grupları.	135
Çizelge 4.4. Dal sayısı karşılaştırılan deney grupları.	136
Çizelge 4.5. İmmunohistokimyası yapılan deney gruplarında LIF reseptörlerinin çoklu karşılaştırılması.	141
Çizelge 4.6. İmmunohistokimyası yapılan deney gruplarında LIF'in çoklu karşılaştırılması.	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Bir nöronun anatomisi. A: Nukleus, B: Hücre gövdesi, C: Akson. D: Dendritler.	3
Şekil 2.2. Arka kök ganglionu anatomisi.	4
Şekil 2.3. Nörotrofinler ve reseptörleri.	9
Şekil 2.4. Nöropoetik sitokin reseptörleri.	14
Şekil 2.5. LIF'in periferik sinir sisteminde hasar tepkilerinin oluşumuna etkisi.	18
Şekil 3.1. Arka kök ganglion kültürü basamakları.	30
Şekil 3.2. İn vivo ortamda siyatik sinir kesisi. A. Derinin açılarak siyatik sinirin açığa çıkarılması. B. Siyatik sinirin kesilmesi. C. Açılan derinin dikişle kapatılması.	31
Şekil 3.3. Petri kabı içinde agarozda gömülen siyatik sinir parçaları ve arka kök ganglion nöronları.	32
Şekil 3.4. Silikon kaplı saat camında arka kök ganglion hücre süspansiyonu.	33
Şekil 3.5. PALM Mikrolaser Sistemi.	35
Şekil 3.6. Zaman aralıklı mikroskopi sistemi.	42
Şekil 3.7. Akson uzunluğu ve nöron alanı ölçümü.	43
Şekil 3.8. Laser taramalı konfokal mikroskop sistemi.	44
Şekil 4.1. Kontrol grubu nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	45
Şekil 4.2. Kontrol grubu nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	45
Şekil 4.3. Kontrol grubu nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	46
Şekil 4.4. İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	47
Şekil 4.5. İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	47
Şekil 4.6. İn vivo ortamda şartlanan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	48

Şekil 4.7. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	49
Şekil 4.8. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	49
Şekil 4.9. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	50
Şekil 4.10. İn vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	51
Şekil 4.11. İn vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	51
Şekil 4.12. İn vitro ortamda şartlanan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	52
Şekil 4.13. Laser taramalı konfokal mikroskopta canlı olarak görüntülenen in vitro şartlanmış nöronların transmisyon (A), calcein (B), PI (C) ve calcein + PI (D) görüntüleri.	53
Şekil 4.14. Laser taramalı konfokal mikroskopta canlı olarak görüntülenen in vitro şartlanmış nöronların transmisyon (A), calcein (B), PI (C) ve calcein + PI (D) görüntüleri.	54
Şekil 4.15. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra Petri kabına alınarak boyanan bir nöronun transmisyon (A) ve Lucifer sarısı (B) görüntüleri.	55
Şekil 4.16. Arka kök ganglion ayrıştırması sırasında floresan dekstran alan bir nöronun transmisyon (A) ve floresan dekstran (B) görüntüleri.	56
Şekil 4.17. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra vasatı asidik yapılarak floresan dekstran eklenen ve ardından ekimi yapılan nöronların transmisyon (A) ve floresan dekstran (B) görüntüleri.	56
Şekil 4.18. Tüm olarak arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon hızı grafiği.	57
Şekil 4.19. Tüm olarak arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.	57

Şekil 4.20. Tüm arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	58
Şekil 4.21. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	59
Şekil 4.22. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	59
Şekil 4.23. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	60
Şekil 4.24. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	61
Şekil 4.25. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	61
Şekil 4.26. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	62
Şekil 4.27. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği rejenerasyon hızı grafiği.	63
Şekil 4.28. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	63
Şekil 4.29. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	64
Şekil 4.30. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	65
Şekil 4.31. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	65
Şekil 4.32. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	66
Şekil 4.33. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	67
Şekil 4.34. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	67

Şekil 4.35. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	68
Şekil 4.36. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	69
Şekil 4.37. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	69
Şekil 4.38. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	70
Şekil 4.39. Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon hızı grafiği.	71
Şekil 4.40. Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.	71
Şekil 4.41. Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	72
Şekil 4.42. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	73
Şekil 4.43. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	73
Şekil 4.44. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	74
Şekil 4.45. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	75
Şekil 4.46. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	75
Şekil 4.47. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	76
Şekil 4.48. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	77

Şekil 4.49. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.	77
Şekil 4.50. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	78
Şekil 4.51. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	79
Şekil 4.52 Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.	79
Şekil 4.53. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	80
Şekil 4.54. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon hızı grafiği.	81
Şekil 4.55. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği .	81
Şekil 4.56. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	82
Şekil 4.57. Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.	83
Şekil 4.58. Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.	83
Şekil 4.59. Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.	84
Şekil 4.60. Kontrol grubu hücrelerle in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	85
Şekil 4.61. Kontrol grubu hücrelerle in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	86
Şekil 4.62. Kontrol grubu nöronlar ile in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	87

Şekil 4.63. Kontrol grubu nöronlar ile in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	87
Şekil 4.64. Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	88
Şekil 4.65. Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	88
Şekil 4.66. Kontrol grubu nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçaları ile kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	89
Şekil 4.67. Kontrol grubu nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçaları ile kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	90
Şekil 4.68. Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	91
Şekil 4.69. Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	91
Şekil 4.70. Kontrol grubu nöronlar ile arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	92
Şekil 4.71. Kontrol grubu nöronlar ile arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	92
Şekil 4.72. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	93
Şekil 4.73. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	94

Şekil 4.74. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği.	94
Şekil 4.75. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	95
Şekil 4.76. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlandıktan sonra aksotomiye uğrayan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği.	96
Şekil 4.77. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlandıktan sonra aksotomiye uğrayan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	96
Şekil 4.78. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği.	97
Şekil 4.79. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	97
Şekil 4.80. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği.	98
Şekil 4.81. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	99
Şekil 4.82. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlandıktan sonra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği.	100
Şekil 4.83. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlandıktan sonra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	100

Şekil 4.84. İn vitro şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	101
Şekil 4.85. İn vitro olarak şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği.	102
Şekil 4.86. İn vitro ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	102
Şekil 4.87. İn vitro ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	103
Şekil 4.88. İn vitro şartlanan nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği	104
Şekil 4.89. İn vitro şartlanan nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	104
Şekil 4.90. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	105
Şekil 4.91. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	105
Şekil 4.92. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	106
Şekil 4.93. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	107
Şekil 4.94. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği.	108

- Şekil 4.95.** Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 108
- Şekil 4.96.** Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 109
- Şekil 4.97.** Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 109
- Şekil 4.98.** Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 110
- Şekil 4.99.** Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 111
- Şekil 4.100.** Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 112
- Şekil 4.101.** Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 112
- Şekil 4.102.** İn vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 113
- Şekil 4.103.** İn vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 114

- Şekil 4.104.** Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 115
- Şekil 4.105.** Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 115
- Şekil 4.106.** Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 116
- Şekil 4.107.** Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 117
- Şekil 4.108.** Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 118
- Şekil 4.109.** Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 118
- Şekil 4.110.** Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 119
- Şekil 4.111.** Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 120

- Şekil 4.112.** LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 121
- Şekil 4.113.** LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 121
- Şekil 4.114.** LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 122
- Şekil 4.115.** LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 123
- Şekil 4.116.** İn vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlar ile anti LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 124
- Şekil 4.117.** İn vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlar ile anti LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 124
- Şekil 4.118.** Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile LIF takviyesiyle arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 125
- Şekil 4.119.** Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile LIF takviyesiyle arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 125

- Şekil 4.120.** Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile anti-LIF ile arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 126
- Şekil 4.121.** Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile anti-LIF ile arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 126
- Şekil 4.122.** İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 127
- Şekil 4.123.** İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 128
- Şekil 4.124.** İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 129
- Şekil 4.125.** İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 129
- Şekil 4.126.** İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği. 130
- Şekil 4.127.** İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği. 130
- Şekil 4.128.** İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların karşılaştırmalı grafiği. 131

Şekil 4.129. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği.	131
Şekil 4.130. İkinci aksotomisi laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile yapılan deney gruplarında aksotomi sonrası rejenerasyon gösteren nöron oranları.	132
Şekil 4.131. Bazı deney gruplarındaki nöronların alan büyüklüğü grafiği.	134
Şekil 4.132. Bazı deney gruplarındaki nöronların akson çapı büyüklüğü grafiği.	135
Şekil 4.133. Bazı deney gruplarındaki nöronların dal sayısı grafiği.	136
Şekil 4.134. Akson çapları, alanları ve dal sayıları karşılaştırılan deney grupları.	137
Şekil 4.135. İmmunohistokimyasal LIF ve LIF reseptör analizleri yapılan deney grupları.	140
Şekil 4.136. İn vivo ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	143
Şekil 4.137. İn vitro ortamda tüm olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan arka kök ganglion nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	144
Şekil 4.138. İn vitro ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	145
Şekil 4.139. Herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	146
Şekil 4.140. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	147
Şekil 4.141. Herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu arka kök ganglion kesiti nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	148
Şekil 4.142. LIF ile NGF arasındaki karşılıklı ilişkinin araştırıldığı nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	149

Şekil 4.143. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek 1 saat şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	150
Şekil 4.144. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek 3 saat şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	151
Şekil 4.145. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek 3 gün şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.	152
Şekil 5.1. Primer duyu nöronunda fizyolojik şartlarda ve hasar sonrası LIF, NGF ve GAL arasındaki hipotetik ilişki.	162

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μl	Mikrolitre
μJ	Mikrojoule
μm	Mikrometre (Mikron)
μm^2	Mikrometrekare
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gravite
Hz	Hertz
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre
ns	Nanosaniye
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

AKG	Arka kök ganglionu
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
BSF3	B hücrelerini stimüle edici faktör ³
cAMP	Siklik Adenozin monofosfat
CCK	Kolesitokinin

CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
ChAt	Kolin asetiltransferaz
CLC	kardiyotrofin benzeri sitokin
CNTF	Sillier nörotrofik faktör
CT1	kardiyotrofin1
db-cAMP	Dibutryl-siklik Adenozin Monofosfat
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAL	Galanin
GAL-R	Galanin reseptörü
GDNF	Glial hücre kökenli faktör
HPSG	heparan sülfat proteoglikan
IB4	İzolektin B4
IL-6	İnterlökin-6
IL-11	İnterlökin-11
IL-27	İnterlökin-27
JAK-STAT	Janus Kinaz-Sinyal Çevireci ve Transkripsiyon Aktivatörleri
L4-L5 AKG	Lumbar4-Lumbar5 arka kök ganglionu
LIF	Lösemi inhibe edici faktör
LIF R β	LIF reseptörü
MAPK	Mitojenin Aktifleştirdiği Protein Kinaz
MCP1	Monosit chemoattractant protein1
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NGF	Sinir büyüme faktörü
NPY	NöropeptidY
NT3	Nörotrofin3
NT4/5	Nörotrofin 4/5
OSM	OnkostatinM
OSMR	OnkostatinM reseptörü
RET	Reseptör tirozin kinaz
SP	P maddesi
STAT3	Sinyal Çevireci ve Transkripsiyon Aktivatörü3

TrkA	Tirozin kinazA
TrkB	Tirozin kinazB
TrkC	Tirozin kinazC
TRPV1	Geçici reseptör potansiyeli vallanoid-1 reseptörü
VIP	Vazoaktif intestinal polipeptid
α LIF	Anti-LIF

1. GİRİŞ

Çeşitli duyu organlarından milyonlarca bilgi parçasını alan, vücudun cevaplarını oluşturmak üzere onları entegre eden sinir sistemi, canlının iç ve dış ortamındaki değişiklikleri saptayarak bunlara uygun yanıtlar vermesini sağlar (Guyton ve Hall, 2001). Sinir sistemi merkezi ve çevresel sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikten meydana gelirken; çevresel sinir sistemini kraniyal sinirler, spinal sinirler, ganglionlar ve özelleşmiş sinir sonlanmaları oluşturur.

Bir canlıda doku ve hücre kaybı sonucu oluşan hasarların giderilerek yeni doku oluşumuna rejenerasyon denir. Bu rejenerasyon merkezi sinir sisteminde yok denecek kadar az iken, periferik sinir sisteminde tam iyileşmeyi sağlayacak kadar etkili olabilir. Ancak bu rejenerasyonla birlikte nörogenez yani yeni sinir hücresi oluşumu gözlenmezken hasar gören aksonların tekrar uzayarak hedef dokular ve hücrelerle bağlantıları yeniden sağlanır (Dahlin, 2004).

Rejenerasyonla birlikte özellikle protein sentezinde değişiklikler meydana gelir. Sinir sistemiyle ilgili proteinlerin gen ifedeleri azalırken büyüme ile ilgili proteinler sentezlenmeye başlar. Akson iskeleti elemanlarından tubulin ve aktinin sentezi artarken nörofilament sentezi azalır. CGRP, SP, VIP, NPY ve Galanin aksotomi sonrası ekspresyonları değişikliğe uğrayan en önemli peptidlerdir. Bir nöron herhangi bir şekilde hasara uğradığında hücre gövdesinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler türe, nöron tipine, lezyon tipine ve lezyonla hücre arasındaki mesafeye bağlıdır. Hücrede meydana gelen tepkilere ‘hücre gövdesi tepkisi’ adı verilir (Jacob ve Croes, 1998).

Bir kez hasarlanmış periferik bir sinirin ikinci kez hasarlanmasıyla birlikte sinir rejenerasyonunda önemli bir artış gözlenir. Bu artışa sebep olan öncül hasara “şartlandırma hasarı” adı verilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar şartlandırma hasarının daha hızlı ve daha fazla rejenerasyona neden olduğunu göstermiş (Bisby ve Pollock, 1983, Carlson, 1983, Forman ve ark.,1980, Jacob ve Mc Quarrie, 1993, Mc Quarrie, 1978, Oblinger ve Lasek, 1984, Sjöberg ve Kanje 1990 a,b, Tanaka ve ark., 1992), ancak bu etkinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Moleküler temelleri tam olarak anlaşılamamakla birlikte daha önceden in vivo olarak aksotomize edilen arka kök ganglionunun primer duyu nöronlarının kültürleri

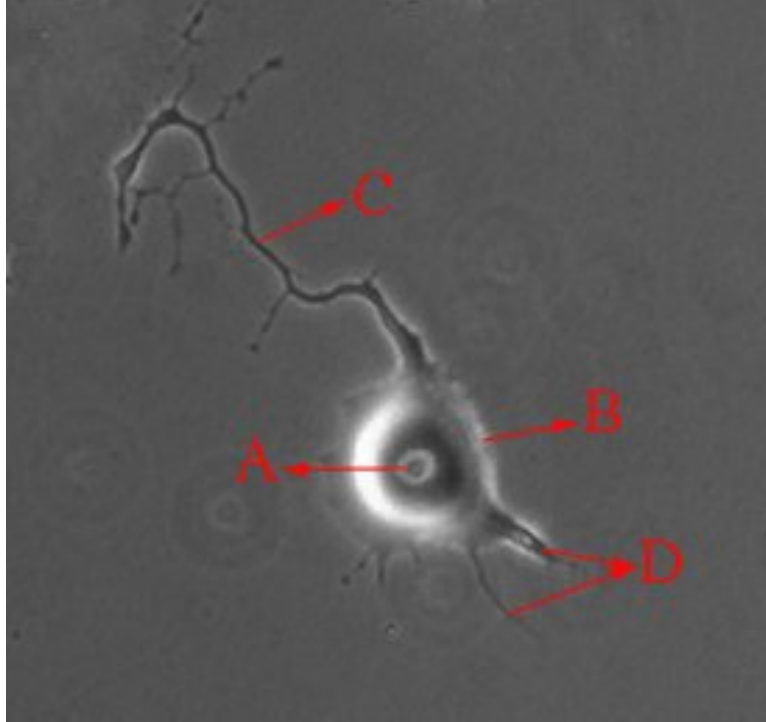
yapıldığında daha fazla akson uzattıkları gösterilmiştir (Hu-Tsai ve ark., 1994, Lankford ve ark., 1998).

Bu tezin amacı, şartlandırma hasarının etki mekanizmasının in vitro modeller kullanılarak araştırılmasıdır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Nöron (Sinir Hücresi)

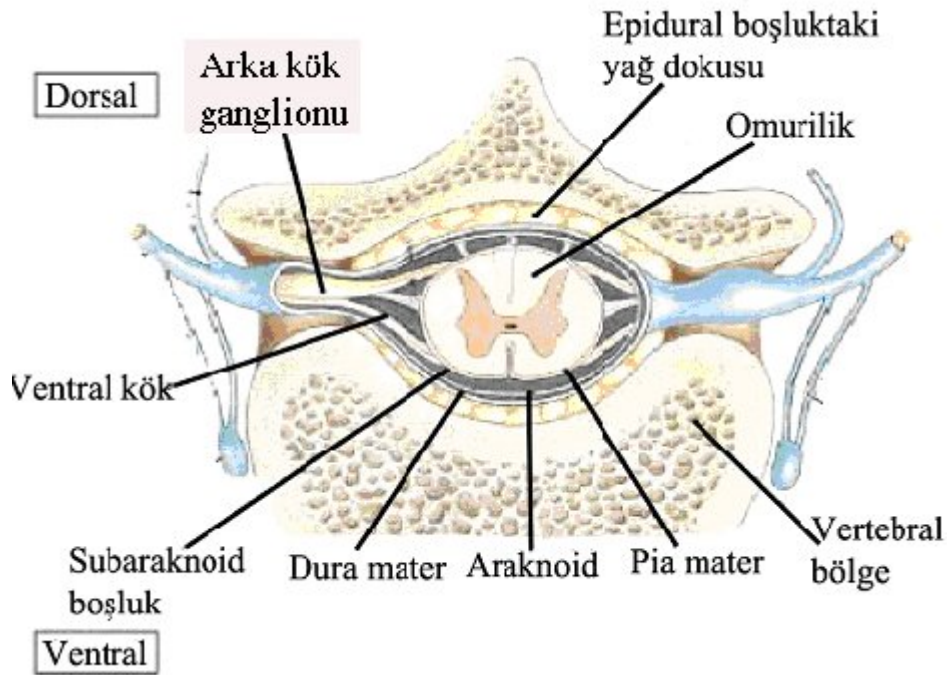
Sinir sisteminin yapısal ve işlevsel bütünlüğe sahip en küçük birimi nörondur. Nöronlar çevrelerindeki kimyasal ve fiziksel değişiklikleri algılayıp bunlara yanıt vermek üzere özelleşmiş hücrelerdir. Sinir uyarılarını diğer nöronlara ve sinir sistemi dışındaki efektör organlara iletmekle görevlidirler. Nöronlar şekil, büyüklük ve görev bakımından farklılıklar göstermesine rağmen ortak bir yapıya sahip hücrelerdir. İçi stoplazmayla dolu perikaryon adını alan bir gövdeden ve gövdeden çıkan akson ve dentrit adlı uzantılardan oluşur (Şekil 2.1). Nöronlar, yapılarına göre; multipolar, bipolar, unipolar ve pseudounipolar olmak üzere dört gruba ayrılır. İşlevlerine göre ise duyu nöronları, motor nöronlar ve ara nöronlar olarak sınıflandırılırlar (Kierszenbaum, 2006).



Şekil 2.1. Bir nöronun anatomisi. A: Nukleus, B: Hücre gövdesi, C: Akson. D: Dentritler.

2.2. Arka Kök Ganglionları

Arka kök ganglionları, komşu iki vertebra arkı arasında bulunan ve primer duyu nöronlarını barındıran ganglionlardır (Şekil 2.2). Bu pseudounipolar nöronların gövdesinden tek bir uzantı çıkar. Daha sonra bu uzantı “T” biçimini alarak iki ana uzantıya ayrılır. Uzantılardan biri periferik dal olup periferik sinir içine giderken, diğeri merkezi sinir sistemine giden merkezi daldır (Bradbury ve ark., 2000). Hücre gövdesi 50-100 mikron büyüklüğündedir. Nissl cisimcikleri denilen düz endoplazmik retikulumu, oldukça bol ve ince granüller halinde düzenli olarak dağılmıştır. Nukleus yuvarlağımsı açık renkte olup; koyu, belirgin nukleolusa sahiptir. Histolojik kesitlerde hücrelerin küçük satellit (uydu) hücrelerince sarıldıkları görülür; bunlar glia hücreleridir. Ganglion hücrelerinin fonksiyonları, değişik duyu reseptörlerince üretilen sinyalleri merkezi sinir sistemine iletmektir.



Şekil 2.2. Arka kök ganglionu anatomisi.

2.3. Sinir Rejenerasyonu

Periferik bir sinirin hasarlanmasının ardından hasarlanan bu sinirde rejenerasyonun gerçekleştiği yüzyıldan fazla süredir bilinmektedir. Bununla birlikte;

fonksiyonel bir rejenerasyon, mikrocerrahi tekniklerin gelişmiş olmasına ve rejenerasyon mekanizmasının aydınlatılmış olmasına rağmen (Kline ve Hudson, 1995), hedeften uzaktaki bir sinirin kopması ve hedefin tekrar innervasyonunun gecikmesi gibi sebeplerden dolayı gerçekleşmeyebilir (Fu ve Gordon, 1997). Genel olarak insanlarda 2 cm.'den daha az kesinti oluşturan sinir yaralanmalarının iyileşebileceği; 4 cm.'den daha fazla hasar oluştuğunda ise, tamirin çok az olduğu bilinmektedir (Navarro ve ark., 2007). Aksonal rejenerasyonun gerçekleşmesi için ilk koşul, nöronun hasar sonrasında hayatta kalması ve rejenerasyon için gerekli metabolik duruma geçebilmesidir. Bu nöronun tipine, canlının yaşına, hasarın niteliğine, derecesine ve hücre gövdesinden uzaklığına bağlıdır. İkinci koşul, hasarın distalinde kalan sinir parçasının rejenerasyona uygun bir ortam sağlamasıdır. Üçüncü olarak da başarılı bir akson rejenerasyonu için uygun hedefin tekrar inerve edilebilmesi gerekir (Fu ve Gordon, 1997).

2.3.1. Periferik sinir hasarı sonrasında duyu nöronlarında meydana gelen değişiklikler

Hasar ardından canlı kalan nöronlar 'kromatoliz' adı verilen bir seri değişikliğe uğrar. Bu nöronlar, sinyal iletim modundan büyüme moduna geçişleriyle birlikte fizyolojik, morfolojik ve moleküler değişikliklere maruz kalırlar. Hücre gövdesinde meydana gelen en dikkat çekici morfolojik değişiklikler; Nissl cisimciklerinin bozulması, nükleer eksantriklik, nükleolusun büyümesi ve hücrenin şişmesidir. Başarılı bir rejenerasyon için kromatoliz vazgeçilmez değildir. Örneğin, arka kök ganglion nöronları çok az bir kromatoliz ile dahi başarılı bir rejenerasyon gerçekleştirebilirler (Hall,1982, Perry ve ark., 1983, Greenberg ve Lasek,1988). Bu değişikliklerle birlikte, hücre alışıldık köşeli yapısını kaybeder ve nükleusun hücre membranına baskısıyla yuvarlak bir görünüm kazanır. Tüm bu değişikliklerin gerçekleşmesi yaklaşık iki hafta alır (Lieberman, 1971).

Periferik sinir rejenerasyonunun gerçekleşmesi süresince nöronlarda, nöropeptid ekspresyonu ve büyüme ile ilgili proteinlerin ve akson iskelet proteinlerinin sentezinde önemli değişiklikler gerçekleşir.

2.3.2 Nöropeptid ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler

Aksotomi sonrası nöron fenotipinde meydana gelen en önemli değişiklik, sinir iletimi ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının azalmasıdır. Ayrıca aksotomize nöronlarda ve onların aksonal uzantılarındaki nöropeptid ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler de dikkat çekicidir. Nöronların protein sentez tercihlerinin yeniden programlandığı, daha çok hayatta kalma ve rejenerasyonda önemli olan moleküllerin üretimine ağırlık verildiği görülür.

Nöropeptidler fizyolojik ve patolojik pek çok süreçte, sinir sisteminin pek çok bölgesinde görev alan, sinir iletimi yanında farklı metabolik etkileri de bulunan biyolojik aktif moleküllerdir (Palkovitz,1995; Hökfelt ve ark., 2000). P maddesi (SP) ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) aksotomi sonrasında ekspresyonu azalan nöropeptidlerdendir (Mc Gregor ve ark., 1984; Nielsch ve ark., 1987; Noguchi ve ark., 1990; Villar ve ark., 1991). Bu dikkat çekici düşüşün nedeni, periferik dokulardan taşınan NGF takviyesinin aksotomi sonrasında kesintiye uğramasıdır (Eriksson ve ark., 1997). Bununla birlikte SP ekspresyonu büyük çaplı nöronlarda artar (Noguchi ve ark., 1995).

Normalde duyu nöronlarında vazoaktif intestinal polipeptid (VIP), histidin-izolösin, galanin (GAL) ve nöropeptid Y (NPY) gibi peptidler düşük seviyede bulunurken, aksotomi sonrasında bunların ekspresyonları artar (Navarro ve ark., 2007). GAL küçük çaplı arka kök ganglion nöronlarının küçük bir bölümü tarafından üretilirken, periferik bir sinir hasarının ardından primer afferent nöronlarda ve yüzeyel dorsal boynuz terminalinde ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Wiesenfeld-Hallin ve Xu,1998). Hasar sonrasında bu artan GAL ekspresyonunun LIF üretiminin artışıyla paralellik gösterdiği ve bu etkiye de IL-6'nın neden olabileceği düşünülmektedir (Murphy ve ark., 1999). Ayrıca aksotomiden sonra AKG nöronlarında GAL-R1 reseptörünün mRNA'sı azalırken ve GAL-R2 reseptörünün mRNA'sında küçük bir düşüş gözlenir (Zhang ve ark., 1998). Yine hasarsız AKG nöronlarında NPY çok az miktarda bulunurken, aksotomiden sonra büyük ve orta boyutlu AKG nöronlarında NPY miktarında dikkat çekici bir artış gözlenir (Wakisaka ve ark., 1991; Ohara ve ark., 1994). NPY reseptörleri ise karmaşık bir regülasyon sergiler; NPY-Y1 reseptörlerinde düşüş, NPY-Y2 reseptörlerinde ise artış gözlenir (Çizelge 2.1).

Belli peptidlerin sentezindeki artış, akson rejenerasyonuna olduğu kadar aksotomize nöronların hayatta kalmalarına da katkıda bulunur. Örneğin VIP'nin mitozu uyardığı, nörit büyümesine katkıda bulunduğu, kültür ortamında sempatik nöronlara destek sağladığı ve hatta NGF yokluğunda dahi sempatik ganglion nöronlarında hücre ölümlerini engellediği bilinmektedir (Pincus ve ark.,1990; Tanaka ve Koike, 1994).

Çizelge 2.1. Aksotomi sonrasında nöronlarda gözlenen nöropeptid ekspresyon değişiklikleri.

Nöropeptid	Motor nöronlar	Sempatik Nöronlar	Duyu Nöronları
ChAt (kolin asetiltransferaz)	↓	—	—
CGRP	↑	—	↓
CCK (kolesitokinin)	↑/↓	↑	↑/↓
Galanin	↑	↑	↑
NPY	↑	↓	↑
Somatostatin	↑	↓	↑
SP	↑	↓	↑
VIP	↑	↑	↑

2.3.3. Nörotrofik faktörlerin sinir rejenerasyonuna etkileri

Nörotrofik faktörler, nöron hayatıyetinde belirleyici etkilere sahip büyüme faktörleridir. Bu özelliklerinin yanı sıra nöronal gelişimde, sinaps oluşumunda ve sinaptik plastisitede de rol alırlar (Lewin ve Barde, 1996; Bibel ve Barde, 2000; Kaplan ve Miller, 2000; Huang ve ark., 2001; Poo, 2001; Shooter, 2001; Dechant ve Barde, 2002; Chao, 2003; Huang ve Reichardt, 2003; Lu ve ark., 2005). Nörotrofik faktörlerin üstlendiği başlıca görevler nöronun hayatta kalmasının sağlanması, proliferasyon, farklılaşma, myelinizasyon, aksonal büyüme ve sinaptik plastisitedir. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra nörotrofik faktörlerin rejenerasyona da katkıda bulundukları bilinmektedir. Hasarlanan sinirlerdeki distal parçada nörotrofik faktörlerin artması, aksonal rejenerasyonla birlikte hedefin tekrar innervasyonunun ardından normal

seviyelerine dönmeleri bu faktörlerin rejenerasyonda doğrudan veya dolaylı olarak etkilerinin olduğunu göstermektedir (Fu ve Gordon, 1997). Bu faktörlerin trofik etkilerinin yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde aktif olarak sinyal iletiminde de görev aldıkları bilinmektedir. Örneğin NGF, inflamatuvar ağrıda CGRP ve SP gibi duyu peptidlerinin ekspresyonlarını düzenleyerek ağrı iletiminde rol oynar (McMahon, 1996). BDNF ise bir nörotransmitterin taşıdığı tüm özellikleri ve fonksiyonları yapısında barındırır (Altar ve DiStefano, 1998).

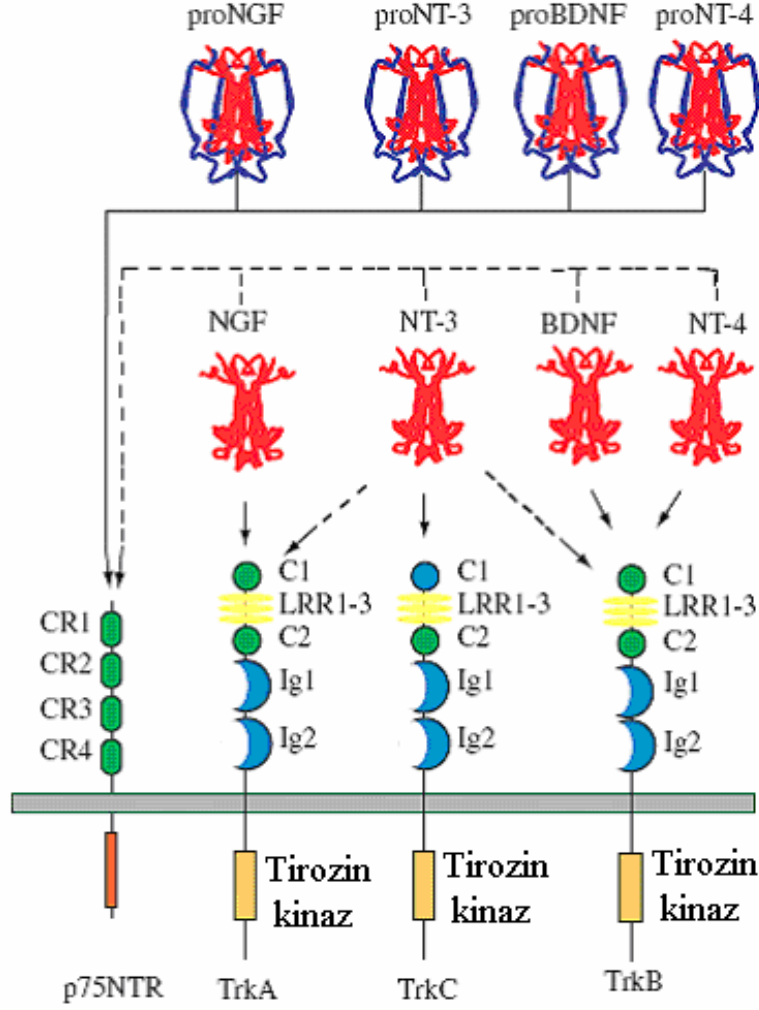
2.3.3.1. Nörotrofinler ve reseptörleri

Nörotrofin ailesinin en iyi bilinen üyeleri; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli büyüme faktörü (BDNF), nörotrofin 3 (NT3) ve nörotrofin 4/5 (NT4/5)'tir. Ayrıca sitokin ailesi olarak bilinen lösemi inhibe edici faktör (LIF), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), glial hücre kökenli faktör (GDNF) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF) de primer duyu nöronlarının sürekliliğine katkıda bulunan diğer moleküllerdir.

İlk keşfedilen nörotrofin olan NGF, prototipik bir nörotrofindir ve aksonal uzama için ihtiyaç duyulan bir faktör olarak bilinir (Levi-Montalcini, 1987). İkinci bir nörotrofin olan BDNF, NGF'e karşı duyarsız olan birçok nöronal popülasyon için hayatta kalmayı sağlayan bir faktördür (Barde ve ark., 1982).

Nörotrofinler, iki farklı reseptöre bağlanırlar. Bunlardan ilki, tüm nörotrofinleri eşit ve düşük bir affiniteyle bağlayan P75'tir. Daha yüksek affinite ile bağlananlar ise üç farklı alt gruba sahip olan tirozin kinaz reseptörleridir (Trk). Bu reseptörlerden TrkA NGF (Kaplan ve ark., 1991; Klein ve ark., 1991a), TrkB BDNF (Klein ve ark., 1991b) ve NT4 (Klein ve ark., 1992) ve TrkC ise NT3 (Lambelle ve ark., 1991) için yüksek affiniteli reseptör fonksiyonu görür (Şekil2.3). Trk'lar genellikle aksonal büyüme, nöronun desteklenmesi, membran trafiği, sinaps oluşumu, glial hücrelerin farklılaşması gibi birçok nöral gelişim ve düzenleme aktivitelerinde ön plandayken (Reichardt, 2006), P75'in, Trk aktivitesi üzerine düzenleyici etkisinin yanı sıra apoptoz, hücresel göç ve nörotrofik faktörlerin retrograd taşınmasının sağlanmasında rol aldıkları görülmektedir (Bamji ve ark., 1998). Yüksek affiniteli TrkA, TrkB ve TrkC reseptörlerinin ve düşük affiniteli P75 reseptörünün mRNA'larının en erken 12. embriyonik günde arka kök ganglionlarında ekspresyonunun gerçekleştiği bilinmektedir (Merlio ve ark., 1992; Ernfors ve ark., 1993; Mu ve ark., 1993). Farklı Trk'lar belli nöron popülasyonlarınca

eksprese edilirler. TrkA, daha çok koyu boyanan sitoplazmaya sahip olan küçük nöronlarca sentezlenir. TrkB orta boy, TrkC ise büyük ve sitoplazması daha az boyanan nöronlarca sentezlenir (Mu ve ark., 1993; Enforns ve ark., 1993; McMahon ve ark., 1994). Diğer taraftan P75 reseptörü farklı boyutlardaki arka kök ganglion nöronları tarafından sentezlenir (Carroll ve ark., 1995; Schecterson ve Bothwell, 1992).



Şekil 2.3. Nörotrofinler ve reseptörleri. Her pronörotrofin p75 reseptörüne bağlanabilir fakat tirozin kinaz reseptörlerine bağlanamazlar. Pronörotrofinlerin proteoliz yoluyla olgunlaşmalarıyla birlikte olgun nörotrofinler p75 reseptörüne bağlanabilir ve üç trk reseptörüyle daha spesifik etkileşim sergilerler. NGF, özellikle TrkA'ya bağlanır; TrkB, BDNF ve NT4'ü tanır; NT3 ise TrkC'yi yüksek affinite ile aktive eder. Bazı durumlarda NT3 daha az affinite ile TrkA ve TrkB'yi aktive edebilir (Reichardt, 2006).

2.3.3.1.1. Sinir büyüme faktörü (NGF)

NGF, ilk keşfedilen, en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan nörotrofik faktördür (Levi-Montalcini, 1951; Cohen, 1960; Levi-Montalcini ve Angeletti, 1968). NGF, erkek farenin tükrük bezlerinden kolaylıkla elde edilebilir. Birçok periferik doku tarafından üretilmesine rağmen genel olarak ekspresyon düzeyi düşüktür (Shelton ve Reichardt, 1984).

NGF'in embriyonik gelişim sırasında, sempatik ve nöral-krest kökenli duyu nöronlarının canlılığının korunmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Levi-Montalcini ve Angeletti, 1968; Johnson ve ark., 1980, 1983; Kessler ve Black, 1980; Otten ve ark., 1980; Lindsay, 1988a). NGF geni ve NGF'in yüksek affinite ile bağlandığı TrkA reseptörü olmayan farelerde yapılan araştırmada ağrı ve sıcaklığa duyarlı olan küçük arka kök ganglion nöronlarını ve aynı zamanda bazı sempatik nöronlarını da geniş ölçüde kaybettikleri gözlenmiştir (Crowley ve ark., 1994; Smeyne ve ark., 1994). Bu bulgular, NGF'in olgunlaşmamış arka kök ganglion nöronlarını ve sempatik nöronları aksotomi sonrasında meydana gelen ölümlerden koruduğu hipotezini desteklemektedir (Hendry, 1975; Yip ve ark., 1984). Klinik nöropati ve nörodejenerasyon çalışmalarında nörotrofinlerin bir yan etki olarak akut ağrı oluşmasına neden oldukları saptanmıştır (Thoenen ve Sendtner, 2002). NGF, inflamasyon sonrasında yüksek seviyede bulunur ve ağrı hassasiyetini artırır. NGF'e duyarlı ağrı ileten duyu nöronlarında hem TrkA hem de geçici reseptör potansiyeli vallanoid-1 reseptörü (transient receptor potential vallanoid-1 TRPV1) ile birlikte daha sık eksprese edilir. Buna benzer mekanizmalar, diğer insan veya hayvan modellerinin kullanıldığı klinik çalışmalar sırasında yüksek dozda nörotrofin uygulamasından sonra ortaya çıkan ağrının sebebini açıklamaktadır (Chao ve ark., 2006).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, periferik ve merkezi sinir sisteminden salınan NGF ve diğer faktörlerle yetişkin arka kök ganglion nöronlarına trofik destek sağlandığını kanıtlamaya yöneliktir. Bu kapsamda, en yaygın deney modelini kesilen periferik bir sinirin proksimal parçasına lokal olarak NGF uygulaması oluşturmaktadır. Bu ve buna benzer çalışmalar, NGF'nin aksotomi sonrasında nöron canlılığının korunmasında etkin rol oynadığını göstermektedir (Hendry ve Campbell, 1976). Bir başka çalışmada aksotomi sonrasında siyatik sinire NGF uygulanmış ve başka hiçbir muamele görmeyen L4-L6 arka kök ganglion nöronlarını ölümden koruduğu

gösterilmiştir (Rich ve ark., 1987; Otto ve ark., 1987). Her ne kadar NGF'in 24 aya kadar olan sıçanların arka kök ganglion nöronlarını desteklediği gösterilmiş olsa da (Manfridi ve ark., 1992), aksotomiye maruz kalan duyu nöronlarının rejenerasyon süresince canlılıklarının korunmasında NGF'in mutlak gerekli bir faktör olmadığına dair tartışmalı yayınlar da mevcuttur. Yetişkin sıçan ve kobaylarda anti serum kullanılarak NGF'in nötralizasyonunun sağlandığı çalışmanın sonucunda nöral kaybın olmadığı bulunmuştur (Gorin ve Johnson, 1980; Schwartz ve ark., 1982). Yine benzer bir çalışmada kobaylarda kronik NGF yokluğunun, arka kök ganglion nöronlarının ölümüne yol açmadığı, ancak nöronların boyutunda %18'lik bir küçülmeye neden olduğu saptanmıştır (Rich ve ark., 1984). İn vitro bir çalışmada ise NGF'nin kültürü yapılan yetişkin duyu nöronlarının uzun süre (3-4 hafta) canlılıklarının korunması için vazgeçilmez olmadığı, ancak aksonal rejenerasyona katkıda bulunduğu saptanmıştır (Lindsay, 1988b). Bu çalışmanın yetişkin hayvanlarda NGF tarafından hücre kurtarılması ihtimalini zayıflattığı görülmektedir. Bununla birlikte bu deneyin dikkatle yorumlanması gerekmektedir. Çünkü bazı nöron kayıplarının nöronların izolasyonu sırasında ayırıştırma basamağında meydana gelmiş olması ve aksotomi sonrasında 'savunmasız' nöronların daha kolay kaybedilebilme olasılıklarının da göz önünde bulundurulması şarttır (Öztürk, 1999).

2.3.3.1.2. Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)

BDNF, nörotrofin ailesinin ikinci olarak izole edilen üyesidir. NGF'in tersine akciğer, kalp ve iskelet kasları dışında BDNF ekspresyonuna rastlanmaz (Leibrock ve ark., 1989; Hofer ve ark., 1990; Maisonpierre ve ark., 1990). Bunun yanı sıra omurilikte dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminde BDNF mRNA'sının ekspresyonu yoğun olarak gerçekleşir (Wetmore ve ark., 1990).

BDNF genlerinin veya BDNF'ye yüksek affiniteyle bağlanan TrkB reseptörlerinin yokluğunun orta boyutlu arka kök ganglion nöronlarının eliminasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Ernfors ve ark., 1994a; Conover ve ark., 1995). Kusurlu BDNF genine sahip hayvanlar canlılıklarını sekizinci postnatal güne kadar korusa da kusurlu TrkB'ye sahip olan farelerde şiddetli merkezi ve periferik sakatlıklar görülür ve bu hayvanlar doğumdan 24 saat sonra ölürlür (Klein ve ark., 1993; Conover ve ark., 1995). Bir başka çalışmanın sonucunda BDNF'in yeni doğan fare ve sıçanların aksotomize

nöronlarını kurtardığı ve gelişim süresince doğal olarak meydana gelen retinal ganglion nöron ölüm oranını azalttığı saptanmıştır (Li ve ark., 1994; Vejsada ve ark., 1988; Ma ve ark., 1988). Tüm bu çalışmalar BDNF'in duyu nöronlarının gelişimlerinde ve olgunlaşmalarında önemli rol oynadığını göstermektedir. BDNF aynı zamanda küçük boyutlu olan arka kök ganglion nöronlarınca da eksprese edilir (Ernfors ve ark., 1990; Barakat-Walter, 1996). Bunlar temelde TrkA eksprese eden hücrelerdir ve NGF, bu grupta BDNF eksprese eden nöronların oranını çarpıcı biçimde artırır (Michael ve ark., 1997). Lokal olarak üretilen BDNF'in otokrin salgı ile etki ettiği ve diğer büyüme faktörlerinin yokluğunda dahi yetişkin sıçan arka kök ganglion kültüründe canlılığın korunmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Acheson ve ark., 1995). Bu nörotrofinin olgun duyu nöronları için baskın bir trofik destek kaynağı olduğu düşünülmektedir.

BDNF'in bir diğer ilginç özelliği de üretildiği hücre gövdesinden sinir sonuna anterograd olarak taşınmasıdır (Altar ve DiStefano, 1998). Bu taşınmanın arka kök ganglion nöronlarından siyatik sinire veya dorsal köke doğru gerçekleştiği gösterilmiştir (Michael ve ark., 1997). BDNF'in bu anterograd taşınmasının beynin çeşitli bölgelerinde de meydana geldiği bilinmektedir (Conner ve ark., 1997; Altar ve ark., 1997; Fawcett ve ark., 1998).

2.3.3.1.3. Nörotrofin 3 (NT3)

NT3'ün klonlanan sekanslarının NGF ve BDNF ile homoloji gösterdiği bilinmektedir (Hohn ve ark., 1990). NT3'ün veya onun reseptörü olan TrkC'nin ekspresyonunda meydana gelen kusurlar şiddetli duyu hasarlarına neden olur. NT3 geni olmayan farelerde ileri derecede hareket kusurları meydana gelirken; bu hayvanların duyu ve sempatik nöronlarında önemli miktarda kayıplar olduğu gözlenir. Ayrıca yine bu hayvanlarda spinal proprioseptif afferentlerinde ve periferik duyu organlarında eksiklik ve arka kök ganglionlarındaki parvalbumin ve karbonik anhidraz pozitif nöronlarında kayıplar gözlenir (Ernfors ve ark., 1994b; Klein ve ark., 1994).

Gelişim sırasında antikor uygulamalarıyla gerçekleştirilen TrkC inhibisyonunun çeşitli nöron populasyonlarında şiddetli duyu hasarlarına neden olduğu saptanmıştır (Lefcort ve ark., 1996). NT3'ün aynı zamanda embriyonik arka kök ganglionlarının canlılığının korunmasında da teşvik edici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Memberg ve Hall, 1995). Diğer nörotrofin ailesi üyelerinin tersine normal hayvanda NT3 mRNA

ekspresyonu seviyesi yüksek iken; periferik sinir aksotomisini takiben bu seviye düşer ve yaklaşık iki hafta sonra normal ekspresyon düzeyine ulaşır (Funakoshi, 1993). NT3'ün kültürü yapılan arka kök ganglion hücrelerinin %60'ından fazlasında canlılığın korunmasını teşvik ettiği (Maisonpierre ve ark., 1990) ve trigeminal mezensefalik nukleustaki proprioseptif nöronlar gibi normalde NGF'e duyarsız olan duyu nöronlarından bazılarını da kurtardıkları saptanmıştır (Hohn ve ark., 1990). Her ne kadar NT3'ün muhtemelen proprioseptif duyu nöronlarını seçici olarak kurtardığı bilinse de (Horry-Lee ve ark., 1993) aynı zamanda bu nörotrofinin yenidoğan farenin aksotomize olan motor nöronlarının canlılığının devamında destekleyici etkisinin olduğu da bildirilmiştir (Li ve ark., 1994).

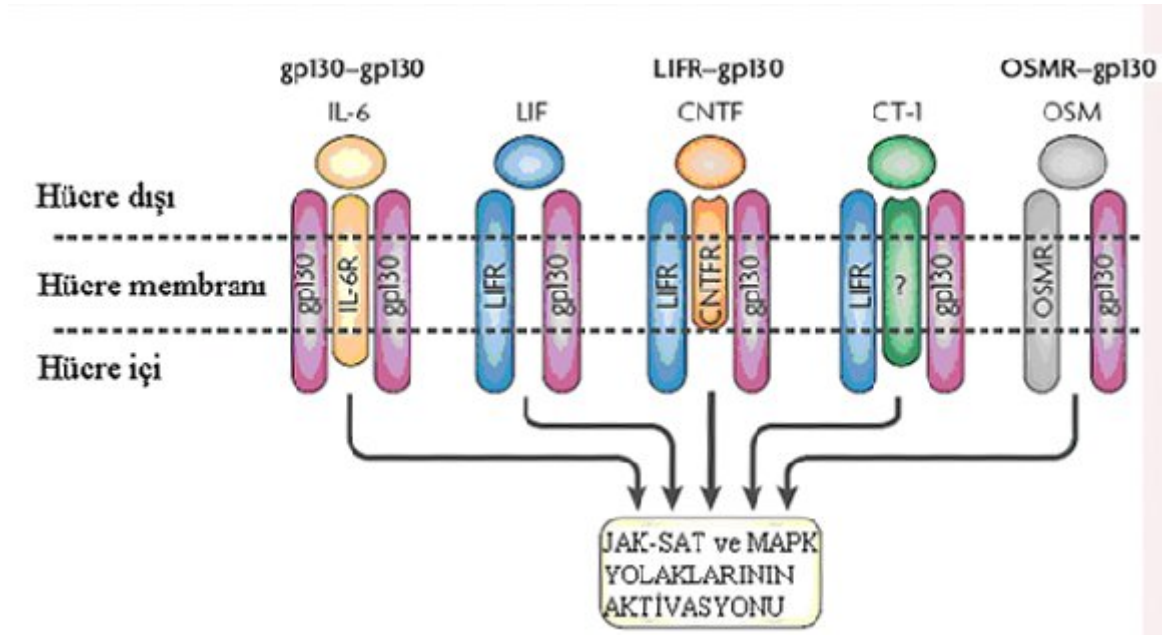
2.3.3.1.4. Nörotrofin 4/5 (NT 4/5)

Nörotrofin 4, ilk kez *Xenopus laevis* 'ten izole edilmiştir (Halbööök ve ark., 1991). Memeli nörotrofini ise iki grup tarafından klonlandığından dolayı NT-4 veya NT-5 olarak adlandırılmış, ancak daha yaygın NT 4/5 olarak anılmaktadır (Berkemeier ve ark., 1991; Ip ve ark., 1992).

NT 4/5 de tıpkı BDNF gibi yüksek affiniteyle TrkB reseptörüne bağlanır (Klein ve ark., 1992). NT 4/5'in diğer nörotrofin ailesi üyelerinden farkı, duyu nöronlarının gelişimi sırasında diğer faktörlere göre canlılığın korunmasında daha az etkiye sahip olmasıdır. Örneğin NGF, BDNF ve NT3 geni kusurlu olan farelerde şiddetli nöronal bozukluklar ve hatta sonrasında ölüm meydana gelirken; NT 4/5'in eksikliği sadece sınırlı sayıda duyu nöronu kaybıyla sonuçlanır (Conover ve ark., 1995; Conover ve Yancopoulos, 1997). Bu faktörle ilgili çalışmalar, NT4/5'in belli embriyonik kranial duyu nöronları için canlılıklarını korumalarında yardımcı bir faktör olduğunu göstermiştir (Davies ve ark., 1993). Yetişkin hayvanlarda ise NT 4/5, retinal (Cohen ve ark., 1994; Peinado-Ramon ve ark., 1996), spinal (Zheng ve ark., 1995) ve trigeminal ganglion hücrelerini (Ibanez ve ark., 1993) kapsayan farklı duyu nöronlarının canlılıklarının korunmasını destekler. Her ne kadar NT 4/5 kusurlu farelerde motor ve sempatik nöronlarda kayıp saptanmamış olsa da bu faktörün neonatal hayvanlarda fasiyal motor nöronların canlılıklarının korunmasında destek görevini yürüttükleri gösterilmiştir (Koliatsos ve ark., 1994; Li ve ark., 1994; Liu ve ark., 1995).

2.3.3.2. Sitokin ailesi

Sitokinler, ilk olarak immün yanıt ile ilgili moleküller olarak karakterize edilmiş olmalarına karşın, çeşitli fizyolojik olaylarda çok geniş etkileri olduğu saptanmıştır. Sitokinler, Janus Kinaz-Sinyal Çevireci ve Transkripsiyon Aktivatörleri (JAK-STAT) yolağını aktive eden gp130 reseptörü ve Mitojenin Aktifleştirdiği Protein Kinaz (MAPK) yolaklarını kullanarak sinyal iletirler (Bauer ve ark., 2007).



Şekil.2.4. Nöropoetik sitokin reseptörleri. Reseptör alt ünitelerinin ve sinyal iletim yolaklarının çeşitli kombinasyonları nöropoetik sitokin ailesinin üyeleri tarafından kullanılır. gp130 heterodimerleri IL-6'yı aktive eden IL-6 reseptörü (IL-6R) gibi spesifik IL reseptörleriyle ilişkilidirler. LIF, LIF reseptörü (LIFR) ve gp130 heterodimerlerine bağlanır. LIFR ve gp130 heterodimerleri aynı zamanda CNTF ve CT-1'i bağlayan diğer reseptör alt üniteleriyle ilişkilidir. Onkostatin M reseptörü (OSMR) onkostatin M'yi (OSM) bağlayan gp130 ile heterodimer oluşturur. Sinyal oluşturan gp130 altünitesi (signal-transducing subunit gp130) tüm komplekslerde bulunur ve hücre içi JAK-STAT ve MAPK yolaklarının aktivasyonundan sorumludur (Bauer ve ark., 2007).

Yapısal olarak birbiriyle benzer olan sitokinler grubu; interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11), interlökin-27 (IL-27), lösemi inhibe edici faktör (LIF), Siliar nörotrofik faktör (CNTF), kardiyotrofin1 (CT1, nöropoetin, kardiyotrofin benzeri sitokin (CLC; CT1 ve CLC, aynı zamanda NNT1 ve BSF3 (B hücrelerini stimüle edici faktör3) olarak da bilinirler)'ten oluşur (Şekil 2.4). Bu proteinlerin gebelik, enfeksiyon, kemik, kas ve kardiyovasküler sistemler üzerindeki etkilerinin yanı sıra gelişmekte olan ve yetişkin beyinde sinyal iletimi ve beyin hasar ve hastalıklarında oluşan cevaplarda görev aldıkları bilinmektedir. Bu özellikleri nedeniyle sitokinler birçok beyin araştırmalarının ana konusunu oluşturur.

Sitokin ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi olan LIF ilk kez 1987 yılında saflaştırılmıştır. 180 aminoasit içeren LIF, 19,7 kDa'luk bir proteindir (Gearing ve ark., 1987). Fonsiyonel LIF reseptörlerini transmembran proteinleri olan LIF R β ve gp130 oluşturur. LIF R β düşük affinite ile LIF'i bağlarken gp130 tek başına LIF'i etkili bir şekilde bağlayamaz. Ancak bu iki alt ünitenin oluşturduğu reseptör kompleksi LIF'i yüksek affiniteyle bağlama yeteneğine sahiptir (Ip ve ark., 1992). Diğer taraftan 140-150 kDa ağırlığına sahip ve yüksek affiniteli üçüncü bir reseptörün var olduğu da bildirilmiştir (Heyman ve ark., 1996).

CNTF, in vitro tavuk silier ganglion nöronlarında canlılığın korunmasını sağlayan bir faktör olarak tanımlanmıştır (Varon ve ark., 1979). İlk kez tavuktan saflaştırılmış, daha sonra ise sıçandan da elde edilmiştir. CNTF, 199 aminoasit rezidüsü içeren 27.2 kDa ağırlığa sahip bir proteindir ve CNTFR- α adlı spesifik bir reseptör kompleksine sahiptir. LIF'in tersine CNTF, periferik sinir Schwann hücrelerinde bol miktarda bulunur (Rende ve ark., 1992).

LIF ve CNTF'nin özellikle gelişim süresince birçok hücre tipi üzerinde trofik ve canlılığı koruyucu etkisi olduğu in vitro ve in vivo bir çok çalışmada gözlenmiştir. Sinir sisteminde bunların temel etkileri duyu ve motor nöronlar üzerinedir. Bu sitokinler, arka kök ganglion nöronlarını aksotominin yol açtığı ölümden korumada da etkilidirler. Ayrıca, yetişkin ve yenidoğan hayvanlarda aksotomi sonrasında aynı nöronların fenotipik özelliklerinin düzenlenmesinde de önemli role sahiptir (Mulder, 1994; Zigmond ve ark., 1996). LIF ve CNTF geni kusurlu olan farelerin motor nöronlarında herhangi bir gelişimsel anormalliğin görülmemesiyle birlikte; bu nöronların canlılığının

korunması ve sürekliliği için yine de önemli bir etken olduğu saptanmıştır (Stewart ve ark., 1992; Escary ve ark., 1993; Masu ve ark., 1993).

2.3.3.2.1. Hasarlanan sinir sisteminde sitokinler

Belli bazı sinyaller, hasarlanan beyin tarafından endojen tamir mekanizmalarını onarmak amacıyla üretilirler. Her ne kadar hasar sonrasında yetişkin sinir sisteminde rejenerasyon kısıtlı olarak gerçekleşse de büyüme faktörleri ve sitokinler gibi eksojen maddelerin tamir işlemlerinin düzenlenmesi ve hatta rejenerasyonun artırılmasında kullanımıyla yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bir umut olarak düşünülmektedir (Bauer ve ark., 2007).

Beyin hasarından sonra tamirin gerçekleşebilmesi için beyin tarafından iki tip endojen sinyal üretilir. Bu sinyallerden biri, ölen hücreleri sentezlediği faktörler, diğeri ise inflamasyonla ilgili sitokinlerdir. Bu konuyla ilgili yapılan çeşitli deneylerde nörogenez indüksiyonunun belli bir inflamatuvar reaksiyon olmaksızın meydana geldiği gözlenmiştir. Bu bulgu da ölen nöronlardan salınan sinyallerin nörogenezisi arttırmış olabileceği ihtimalini işaret etmektedir (Agasse ve ark., 2004).

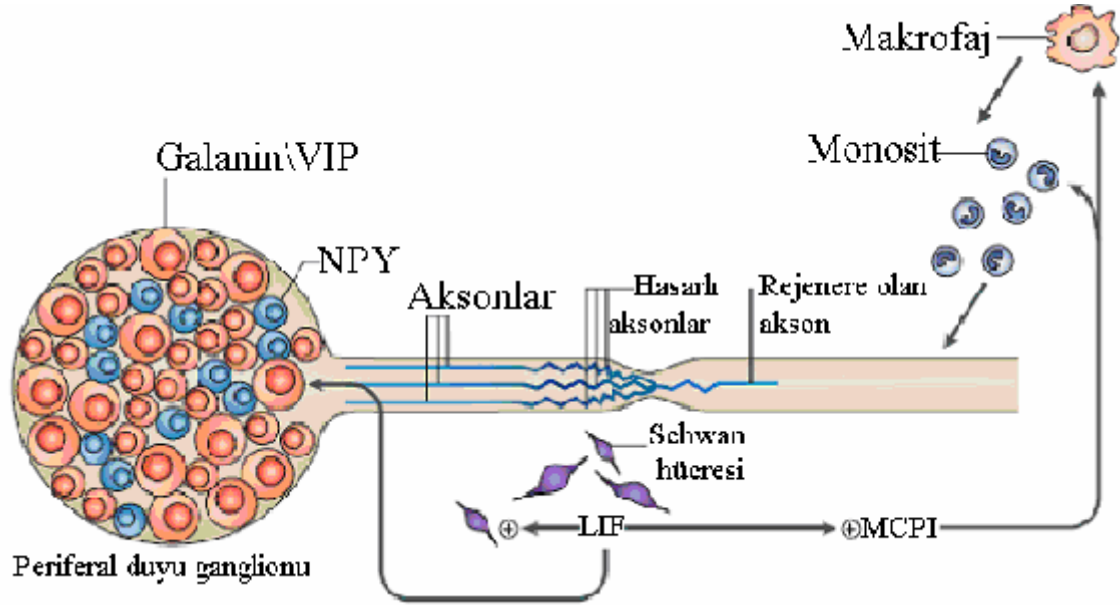
Normal fizyolojik şartlar altında sinir sisteminde LIF ekspresyonu oldukça düşük seviyede; travma, iskemi ve inme gibi çeşitli tipteki hasarların ardından LIF miktarı kısa sürede ve hızlıca artar (Banner ve ark., 1997; Suzuki ve ark., 2000). Hasarlı yetişkin olfaktor epiteline progenitor hücrelerin proliferasyonunun indüklenmesinde LIF'in gerekli olduğunu göstermek amacıyla yapılan bir çalışmanın sonucunda LIF'in bir kısmının ölmekte olan olfaktor duyu hücreleri tarafından sentezlendiği saptanmıştır. Buna göre LIF'in ölmekte olan bu nöronların yerine geçecek olan yeni nöronların oluşumunda 'otorejeneratif faktör' olarak etki ettiği düşünülmektedir (Bauer ve ark., 2003). Buna ek olarak eksojen LIF'in iskemiye uğrayan nöronları kurtarabildiği bildirilmiştir (Suzuki ve ark., 2005). Bu yüzden LIF'in hem belli beyin bölgelerinde proliferasyonu artırıcı etkisi olduğu, hem de canlılığın korunmasında indükleyici etki gösterdiği düşünülmektedir.

2.3.3.2.2. Nörotrofik ve rejeneratif aktivitelerde sitokinler

Sitokinlerin merkezi ve periferik sinir sisteminde farklı şekillerde meydana gelen hasarların ardından oluşacak tepkilerin düzenlenmesinde rol aldıkları bilinmektedir. İn

vivo olarak LIF'in periferik ve sempatik duyu nöronlarında meydana gelen hasarı takiben Gal, VIP, NPY ve SP gibi çeşitli nöropeptidlerin ekspresyonlarını düzenledikleri saptanmıştır (Rao ve ark., 1993; Zigmond ve Sun, 1997). Nöropeptidler nöronal canlılığın sürekliliğinin sağlanmasını nörotrofik etkilerini kullanarak sağlarlar. Nöropeptidler aynı zamanda immun sistem hücreleri için kemotaktik ajanlar olarak rol oynayabilirler veya oluşabilecek inme ya da diğer döngüsel aktivitedeki anormalliklere karşı koyabilmek için beyindeki elektriksel aktivite dengesini değiştirebilirler (Stanke ve ark., 2006).

Sinir hasarı birçok nöropoetik sitokin üzerinde ekspresyonlarını artırıcı etkiye sahiptir. Örneğin LIF'in Schwann hücreleri başta olmak üzere ekspresyonu hasar sonrasında hızlıca artar (Şekil 2.5). Buna benzer olarak hasar sonrasında farklı miktar ve hızda onkostatin M (OSM), IL 6 ve IL 11'in de ekspresyonu artar (Ito ve ark., 2000; Ito ve ark., 1998). Diğer sitokin ailesi üyelerinin tersine CNTF hasarlanmayan sinirde yüksek miktarda eksprese edilirken; periferik bir hasarın ardından ekspresyonunun azaldığı gözlenir (Friedman ve ark., 1992). Ayrıca siyatik sinir hasarından sonra LIF ve CNTF'nin duyu ve motor nöronlarına retrograd taşınımının arttığı da gözlenmiştir (Curtis ve ark., 1993; Thompson ve ark., 1997).



Şekil 2.5. LIF'in periferik sinir sisteminde hasar tepkilerinin oluşumuna etkisi. Normal periferik duyu ganglionlarında VIP ve Galanin gibi çeşitli nöropeptidlerin gen ifadeleri düşüktür. Bu hücrelerin aksonlarına uygulanan hasarlar, öncelikle Schwann hücrelerinde olmak üzere, LIF artışına yol açar. Artan LIF üretimi, dejenere olan sinirlerde monosit ve makrofajların toplanmasına yardım eden Monosit kemoatraktant proteinI (MCP1)'in gen ifadesinin artışına yol açar. LIF, aynı zamanda VIP ve Galaninin artışından sorumlu olduğu duyu nöronlarına retrograd olarak taşınır. Ayrıca LIF hasarlanan ganglionda NPY'nin artışı için de önemlidir (Bauer ve ark., 2007).

2.3.3.3. Glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF)

GDNF, orta beyin nöronlarının canlılığın korunmasını ve dopamin üretimini arttıran transforme edici büyüme faktörü β (TGF β) süper ailesinin bir üyesidir. GDNF, özdeş iki aminoasit zincirinden oluşan yaklaşık 130 kDa moleküler ağırlığa sahip disülfid bağlı bir homodimerdir (Lin ve ark., 1993). GDNF'i bağlayan reseptör kompleksi, GFR α -1 ve RET (reseptör tirozin kinaz)'den oluşur (Treanor ve ark., 1996).

GDNF geninin eksikliği, farelerde renal agenesi ve bütün enterik nöronların yokluğuna neden olur. Bu hayvanlarda motor, duyu ve sempatik nöron sayılarında önemli miktarda azalmanın olduğu gözlenir (Moore ve ark., 1996). GDNF'in embriyogenez ve postnatal dönemde arka kök ganglion nöronlarını desteklediği saptanmıştır (Buj-Bello ve ark., 1995). Normal şartlar altında düşük miktarlarda olduğu

tespit edilen GDNF ekspresyonunun embriyo ve yetişkin hayvanlarda siyatik sinir hasarından sonra yüksek oranda arttığı belirlenmiştir (Trup ve ark., 1995; Hammarberg ve ark., 1996). GDNF'in neonatal sıçanlarda L4-L5 arka kök ganglionlarına retrograd taşındığı ve bu hayvanlardaki aksotomize nöronları kurtardığı saptanmıştır (Matheson ve ark., 1997). GDNF'in aynı zamanda aksotomi sonrasında retinal ganglionların canlılıklarının sürdürülmesine katkıda bulundukları da bildirilmiştir (Koeberle ve Bal, 1998). GDNF reseptör kompleksi, yetişkin sıçanlardaki çoğu izolektin B4 (IB-4)'ü bağlayan arka kök ganglion nöronları tarafından eksprese edilirler ve bu faktör normal şartlarda NGF'e karşı duyarsız olan bu hücrelerde meydana gelen bir kısım değişikliklerden bu hücreleri koruyabilir (Bennet ve ark., 1998). Bununla paralel olarak, eksplant kültürde arka kök ganglionlarında satellit hücrelerinde spontan olarak meydana gelen ölümleri azalttığı ve IB4 bağlayan hücrelerde aksonal büyümeyi teşvik ettiği bildirilmiştir (Leclerc ve ark., 1997). Tüm bu çalışmalar, yetişkin arka kök ganglion nöronlarında Trk (-) primer duyu nöronlarının GDNF'ye duyarlı olduklarını ve bu faktör tarafından desteklendiğini işaret etmektedir. IB4'ü bağlayan nöronlar gelişim süresince canlılığın sürdürülmesi için NGF'ye bağlı hücreler olarak bilinirler (Silos-Santiago ve ark., 1995). NGF bağımlılığından GDNF bağımlılığına dönüşüm TrkA ekspresyonunun azaldığı ve RET ekspresyonunun en üst seviyeye ulaştığı zaman meydana gelir (Molliver ve ark., 1997).

2.3.3.4. Fibroblast büyüme faktörleri (FGF)

FGF'ler birbiriyle akraba olan 25 üyeye sahip bir polipeptid grubudur (Kato ve Kato, 2005). İlk olarak tanımlanan ve en çok çalışılanlar asidik ve bazik FGF'ler: FGF1 ve FGF2'dir. Bunlar beyin dokusundan ve salgı bezlerinden izole edilir. FGF'ler heparin ve heparan sülfat proteoglikan (HPSG) gibi ekstraselüler matriks makromoleküllerine bağlanırlar. Bu özellikleri sayesinde hem faaliyetleri düzenlenir hem de inaktif hale geçişleri kısıtlanır. Bu yüzden heparin bağlayan büyüme faktörleri olarak da adlandırılırlar (Gospodarowicz ve Cheng, 1986; Rifkin ve Moscatelli, 1989).

FGF'ler hemen hemen tüm organlarda çeşitli dokularda ve tümörlerde bulunur (Baird, 1986). Ancak en önemli yerleşim merkezi, sinir sistemidir. Hem FGF1 hem de FGF2 beyin nöronlarında ve glialarda yerleşim gösterirler.

FGF'ler iki farklı gruptaki reseptörlerle etkileşirler. İlk grubu ileri derecede homoloji gösteren yüksek affiniteli dört farklı tirozin kinaz hücre yüzey reseptörü FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4 oluşturur (Johnson ve Williams, 1993). İkinci grup reseptörler düşük affiniteli HPSG'lardır. FGF'leri bağlayan iki proteoglikan bulunmaktadır. Bunlar; integral membran proteoglikanı olan Syndecan (Kiefer ve ark., 1990) ve hücre yüzeyi ve ekstraselüler matrikste bulunan Glypikandır (Brunner ve ark., 1991). Yüksek ve düşük affiniteli bu reseptör komplekslerinin özgün hücrel tepkilerin oluşmasını düzenledikleri düşünülmektedir.

FGF'lerin temel biyolojik aktiviteleri arasında; mitogenez, angiogenez, kemotaksis ve farklılaşma bulunmaktadır (Burges ve Maciag, 1989; Baird, 1994). Yapılan çeşitli çalışmalarla bu moleküllerin kültürü yapılan hipokampal nöronlarının canlılıklarının sağlanmasında etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Wallicke ve ark., 1986; Wallicke, 1988). FGF'lerle yapılan başka bir çalışma da bu faktörlerin retinal ganglion hücrelerinde rejenerasyonu arttırıcı bir etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Park ve Hollenberg, 1993).

Periferik sinir sisteminde FGF'lerin ve reseptörlerinin dağılımı oldukça karmaşıktır. Hasarlanmamış bir hayvanda arka kök ganglion nöronlarında hem FGF1 hem de FGF1 mRNA'sı bulunurken (Oelling ve ark., 1995); bunlardan ancak birkaçında FGF2'nin ekspresyonuna rastlanır (Ji ve ark., 1995). Bir aksotomi sonrasında ise, FGF1'in ekspresyonu siyatik sinirin distal parçasında azalırken; FGF2'nin ekspresyonu ise hem distal hem de proksimal parçada hızla artar (Eckenstein ve ark., 1991; Grothe ve ark., 1997). Periferik sinir sisteminde FGF'lerin ve reseptörlerinin kaynağı belirgin olmamakla birlikte, bazı araştırmacılar FGF1, FGF2 ve FGFR1'in üretiminden Schwann hücrelerini sorumlu tutarken (Neuberger ve De Vries, 1993; Grothe ve ark., 1997), bazı araştırmacılar ise FGF1, FGFR1 ve FGFR2'nin in vitro şartlarda nöronlar tarafından eksprese edilebildiklerini göstermişlerdir (Oelling ve ark., 1995).

2.3.4. Sinir rejenerasyonunda şartlandırma hasarı etkisi

Nöronlar aksotomi olduklarında çoğu kez akson rejenerasyonu için hazırlığa başlarlar. Eğer bu nöronların aksonları, ilk "şartlandırma hasarının (conditioning lesion)" genellikle proksimalinde olan ikinci bir "test hasarı" daha alırlarsa,

şartlandırma hasarına maruz kalmayan nöronlarla karşılaştırıldığında daha fazla rejenerasyon oldukları gözlenir. Bu artan rejenerasyon fenomeni, “şartlandırma hasarı etkisi” olarak adlandırılır (Forman ve ark., 1980). Bu etkiyi araştırmak amacıyla yapılan çoğu çalışma sinire (özellikle siyatik veya optik sinir) uygulanan hem şartlandırma hem de test hasarları ile gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç olarak uygulanan bir şartlandırma hasarının ardından aksotomize olan nöronlarda bir dizi morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir (McQuarrie ve Garfstein, 1982; Redshaw ve Bisby, 1987; Perry ve ark., 1987; Jacob ve McQuarrie, 1991; Tetzlaff ve ark., 1996). Şartlandırma hasarının etkilerinin araştırılması aksonal rejenerasyonu düzenleyen mekanizmaların aydınlatılmasına ve bu rejenerasyonu arttırmaya yönelik mekanizmaların geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Örneğin; arka kök ganglionlarındaki nöronların periferik dallarına uygulanan bir şartlandırma hasarı, cAMP seviyesini arttırarak, bu nöronların merkezi sinir sistemine giden dallarının gelişmesine katkıda bulunur. Bu etki arka kök ganglionları içine cAMP enjeksiyonuyla taklit edilmiştir (Qui ve ark., 2002).

Şartlandırma hasarı etkileri, birçok farklı hayvan türleri üzerinde yapılan deney modelleriyle araştırılmıştır. Sıçanların siyatik sinirine uygulanan şartlandırma hasarının ardından, bu hasarın proksimaline uygulanan test hasarından sonra, spinal motor nöronlarında meydana gelen rejenerasyonun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında arttığı gözlenmiştir. Ayrıca rejenerasyonun ilk gecikme süresinde azalma, aksonal uzama hızında artış ve motor fonksiyonlarının tekrar geri kazanılma süresinde kısalma gerçekleşmiştir (McQuarrie, 1978; Forman ve ark., 1980; McQuarrie ve Grafstein, 1981; Navarro ve Kennedy, 1990; Sjöberg ve Kanje, 1990a; Jacob ve McQuarrie, 1991; 1993). Aksonal rejenerasyonda ortaya çıkan benzer artış, şartlandırma hasarı sonrasında kurbağa siyatik sinirinde de meydana gelmiştir (Carlson, 1983; Perry ve ark., 1987; Edbladh ve Edstrom, 1989). Şartlandırma hasarının aynı zamanda sıçanların fasiyal sinirlerinde motor nöronların aksonal rejenerasyonunu da arttırdığı saptanmıştır (Tetzlaff ve ark., 1996). Balıklarda yapılan bir başka araştırmada da, yine şartlandırma ve test hasarlarının ardından aksonal rejenerasyonda ilk gecikme süresinin kısaldığı ve aksonal büyüme hızının arttığı görülmüştür (Lanners ve Grafstein, 1980; Reich ve ark., 1990). Zhang ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada lamprey (bofa balığı) larvası rostral spinal kordunun transeksiyonundan sonra şartlandırma hasarının hücresel cevabı

etkileyerek ve muhtemelen aksonal rejenerasyonda başlangıç gecikme süresinin kısaltılması ile rejenerasyona katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2004).

Şartlandırma hasarı çalışmalarının çoğu periferik sinir üzerinde yapılmıştır. Bunun nedeni, hem şartlandırma hem de test hasarının birlikte uygulanabilmesidir. Şartlandırma hasarı etkilerini açıklamak amacıyla genellikle iki mekanizmadan bahsedilir; bunların ilki, hücre gövdesi tepkileridir. Bir şartlandırma hasarından sonra aksotomize nöronlar bir sonraki test hasarından sonra aksonal rejenerasyon moduna daha kolay geçerken bazı biyokimyasal değişiklikler gözlenir. Bu biyokimyasal değişiklikler; RNA ve protein sentezinde artış (McQuarrie, 1985; Redshaw ve Bisby, 1987), cAMP seviyesinde artış (Qui ve ark., 2002), nörofilament sentezinde azalma (Tetzlaff ve ark., 1996), aksonal taşıma elemanı yavaş bileşen b'nin miktar ve hızındaki artıştır (Jacob ve McQuarrie, 1991). Şartlandırma hasarının ardından zaten rejenerasyon moduna geçen nöronlarda test hasarının ardından aksonal rejenerasyonun ilk gecikme süresi azalır ve aksonal uzama hızı artar. Bazı araştırmacılar şartlandırma hasarı etkisinde en önemli rolü hücresel etkilerin oynadığını ileri sürerler (McQuarrie ve Garfstein, 1982; McQuarrie, 1985; Jacob ve McQuarrie, 1991; 1993; Tetzlaff ve ark., 1996). Örneğin kurbağalarda hücre seviyesindeki cevabın inhibe olduğu düşünülen 15 °C sıcaklıkta uygulanan şartlandırma hasarının etkisi, 25 °C'de uygulanan şartlandırmanın etkisinden çok daha düşük bulunmuştur (Carlson, 1983).

Şartlandırma hasarını ortaya çıkardığı düşünülen bir başka unsur çevresel faktörlerdir. Bu konuyla ilgili çalışmalar, “hasarın çevresindeki dejeneratif doku, şartlandırma hasarının ardından bu bölgeye doğru büyüme konilerinin uzamasını kolaylaştırıcı bir ortam hazırlar ve aksonların büyümesi glia ve diğer hücreler tarafından salınan faktörlerin etkisiyle artırılır” hipotezini ileri sürmektedir (Bisby ve Pollock, 1983; Bisby ve Keen, 1985; Cho ve So, 1989; Edbaldh ve Edstrom, 1989; Reich ve ark., 1990; Sjöberg ve Kanje, 1990b; Lu ve Richardson, 1991). Bir çalışmada, şartlandırma hasarı uygulanan sıçan siyatik sinirinde, hasar bölgesinin etrafındaki glia ve nöron dışı hücreler geçici olarak dondurulmuş ve sonuçta şartlandırma hasarının aksonal rejenerasyonu artırıcı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Sjöberg ve Kanje, 1990b).

Periferik bir hasar sonrasında artan nöronal büyüme kapasitesinden hasar bölgesinde ekspresyonu artan sitokinlerin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Banner ve Patterson, 1994). LIF ve IL6'nın kültürü yapılan nöronlarda nörit büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (Cafferty ve ark., 2001;2004). Daha önce yapılan çalışmalar da hem IL6 hem de LIF geni olmayan farelerde periferik sinir rejenerasyonunun bozulduğu saptanmıştır (Zhang ve ark., 1998; Cafferty ve ark., 2001). Merkezi sinir sisteminde dorsal kolon aksonlarının bir şartlandırma hasarıyla uyarılmış rejenerasyonun IL-6 geni olmayan farelerde gözlenmemesi stokinlerin şartlandırma hasarındaki etkilerinin önemini desteklemektedir (Cafferty ve ark., 2004). Sitokinlerin bu rollerini göstermek amacıyla şartlandırma hasarı uygulanan LIF -/- fareden alınan arka kök ganglion nöronlarının kültürü yapılmış ve şartlandırma hasarı uygulanan normal fareden alınan arka kök ganglion nöronlarının rejenerasyon oranı karşılaştırıldığında bu oranın %40 düştüğü gösterilmiştir (Cafferty ve ark., 2001). Bir başka çalışmada da IL6 -/- fareye uygulanan şartlandırma hasarının ardından rejenerasyon artışında %60'lık bir düşüş saptanmış ve IL6'nın kültür ortamına eklenmesiyle birlikte aksonal büyümenin kontrol değerlerine döndüğü gösterilmiştir (Cafferty ve ark., 2004).

Bir hasar sonrasında periferik sinir sisteminde rejenerasyon gözlenirken, aynı rejenerasyona merkezi sinir sisteminde rastlanmaz. Bu nedenle bazı araştırmacılar şartlandırma hasarının merkezi sinir sisteminde de etkili bir rejenerasyona neden olup olamayacağı göstermek amacıyla çalışmalar yapmaya başlamışlardır. Periferik sinir sistemi ile merkezi sinir sistemi arasındaki bu rejenerasyon kapasitesi farkının iki sistemin intrinsik mekanizmasından çok çevresel faktörlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Periferik sinir sisteminde hasar sonrasında myelin kalıntıları temizlenir ve Schwann hücreleri tekrar büyümeyi sağlamak amacıyla myelinleme modundan rejenerasyon moduna geçiş yapar (Scherer ve Salzer, 1996). Ancak merkezi sinir sisteminde hasar sonrasında durum farklıdır, myelin kalıntıları çok yavaşça temizlenir ve hasardan ancak saatler sonra glial skar oluşmaya başlar (McKeon ve ark., 1995). Merkezi sinir sisteminde bulunan rejenerasyon inhibitörleri hasar sonrasında daha hızlı gerçekleşmesi gereken rejenerasyonu engeller (Huang ve ark., 1999). Ancak yapılan çalışmalar bu engelin aşılmaz olmadığını, intrinsik nöronal büyüme yeteneği arttırıldığında (örneğin şartlandırma hasarı etkisiyle) bu inhibisyonun kısmi olarak aşıldığını göstermiştir (Qui ve ark., 2002). Bir uzantısı periferik dokulara, diğer uzantısı

merkezi sinir sistemine giden arka kök ganglionlarının periferik dalı kesildiğinde rejenerasyon meydana gelirken; aynı hücre gövdesinden çıkan ve merkezi sinir sistemine giden dal kesildiğinde aynı rejenerasyon oluşmaz. Önce periferik dalı hasarlanan bir arka kök ganglionunun ikinci bir hasarın ardından merkezi sinir sistemine giden dalında az miktarda bir rejenerasyon görülür ki, bu da şartlandırma hasarının merkezi sinir sistemi rejenerasyonuna da katkıda bulunabileceği işaret etmektedir (Neumann ve Woolf, 1999). Bunu aydınlatmak için son yıllarda pek çok araştırmacı farklı çalışmalar yapmıştır. Nöronal büyümeyi artıran ajanların, periferik hasarların şartlandırma hasarı etkisini taklit edebildiği ve merkezi sinir sistemi içine kısıtlı bir aksonal rejenerasyonu uyurabildiği bulunmuştur (Qui ve ark., 2002). Örneğin, yapılan bir çalışmada: arka kök ganglionlarına Dibutryl-siklik Adenozin Monofosfat (db-cAMP) enjeksiyonu yapılmış ve siyatik siniri kesilerek şartlandırma hasarına maruz kalan arka kök ganglionları ile rejenerasyon davranışları karşılaştırılmıştır. Sonuçta: db-cAMP enjeksiyonu yapılan arka kök ganglionları ile şartlandırma hasarına maruz kalan arka kök ganglionlarının omuriliğe uzanan aksonlarında benzer rejenerasyon artışına rastlamıştır. Bu bulguya göre, cAMP'nin şartlandırma hasarı etkisini taklit etmede yeterli olduğu ileri sürülmüştür (Qui ve ark., 2002). Şartlandırma hasarıyla artan spinal akson rejenerasyonunda sitokin ailesi üyelerinden IL-6'nın etkisini göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada siyatik siniri kesilerek şartlandırma hasarına maruz kalan IL-6 geni olmayan fareler ile aynı şekilde şartlandırma hasarı uygulanan normal fareler karşılaştırılmıştır. Sonuçta IL-6 geni olmayan farelerin spinal aksonlarında rejenerasyon olmadığı saptanmıştır. Buna göre; spinal aksonların şartlandırma hasarıyla artan rejenerasyonun meydana gelmesinde IL-6'nın anahtar rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Cafferty, 2004). Fakat daha sonra yapılan başka bir çalışmada ise periferik bir şartlandırma hasarı sonrasında normal ve IL-6 geni kusurlu olan farelerin rejenerasyon davranışlarında fark olmadığı gözlenmiştir. Hem cAMP miktarının hasar sonrasında artmasının hem de şartlandırma hasarı tepkisinin oluşmasının IL-6'nın artışına sebep olduğu gösterilmiştir. IL-6'nın bu artışı, in vivo ortamda spinal akson rejenerasyonunu artırmak için myelinle ilgili inhibitörleri engellemeye yetecek kadar etkili olduğu, ancak cAMP ve şartlandırma hasarı oluşturmak için şart olmadığı, daha etkili aksonal rejenerasyon için IL-6 ile birlikte farklı faktörlerin kombinasyonlarına da ihtiyaç olduğu ileri sürülmüştür (Cao ve ark., 2006). Şartlandırma hasarıyla artan spinal

akson rejenerasyonuna etki eden faktörleri araştırmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada: in vivo ortamda Janus Kinaz2 inhibitörünün perinöral enjeksiyonu ile Sinyal Çevireci ve Transkripsiyon Aktivatörü3 (STAT3) inhibe edildikten sonra siyatik sinir kesisiyle şartlanan spinal aksonlarda rejenerasyonun önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Buna göre STAT3 aktivasyonunun, arka kök ganglion nöronlarının artan büyüme kapasitesi için gerekli olduğu ve şartlandırma hasarını takiben omurilikteki aksonal rejenerasyona katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Qui ve ark., 2005).

Her ne kadar tüm bu çalışmalar, periferik ve merkezi dalları hasara uğrayan arka kök ganglion nöronlarında farklı moleküler değişikliklerin meydana geldiğini ve büyüme kapasitesini de sadece önceki hasarın (şartlandırma hasarı) arttırdığını gösterse de özellikle merkezi sinir sisteminde oluşan hasarların ardından bu etkinin tedavi amaçlı kullanımı risklidir. Bu nedenle öncelikle şartlandırma tepkisinin doğası, hücresel ve moleküler mekanizmasının anlaşılması gerekir. Şartlandırma etkisi henüz tam anlaşılmış değildir ve hala üzerinde çalışan pek çok araştırmacı bulunmaktadır. Öncelikle bu etkinin ne olduğuna niteliksel ve niceliksel olarak yaklaşmak gerekir: Artmış rejenerasyon hızı yegane gösterge olabilir mi? Anlık çekilen fotoğraflar bir süreci ne derece özetleyebilir? Bu soruların cevabı akson rejenerasyonun mümkün oldukça fazla parametrelerle derinlemesine bir zamansal analizini gerektirir. Aksotomi olan nöronların cevabı ve çevrenin etkisi şartlandırma etkisine ne derece ve nasıl katkıda bulunurlar? Bunu araştırmanın en uygulanabilir yolu bu hücresel ve çevresel faktörlerin kontrol altında tutulabildiği yeni bir deney modeli ve araştırma paradigmasını gerektirir. Mevcutta da bazı modeller olmasına rağmen, bu modeller öncelikle in vivo ortamda siyatik sinire uygulanan hasarın ardından in vitro ortamda araştırmaya olanak sağladığından, tamamen in vitro ortamda şartlandırma etkisini araştırma ve şartlanma sırasında ortama müdahale etme şansını vermemektedir.

Bu çalışmada yeni ve kapsamlı bir deney paradigması geliştirilirken mevcut modellerden de yararlanıldı ve in vivo deneylerle in vitro yaklaşımlar aynı paradigma içinde birleştirildi. Bu sayede gerek periferik gerekse merkezi sinir sisteminde şartlandırma hasarı sonrasında artan rejenerasyon kapasitesinin aydınlatılmasında hem hücresel hem de moleküler seviyede yapılacak yeni çalışmalara da zemin oluşturuldu.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Deney hayvanı olarak 6-12 haftalık Balb-C ırkı dişi fareler kullanıldı. Fareler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Neuroscience Araştırma Birimi'nden temin edildi.

3.1.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri ile ilgili ayrıntılar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sarf malzeme listesi.

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
Neuro Basal A (NBA)	Invitrogen	10888
RPMI 1640	Sigma	R0883
Hank'ın Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS)	Sigma	H9269
Kollajenaz	Sigma	C7657
Tripsin	Sigma	T4424
Deoksiribonükleaz I (DNAz)	Sigma	D4513
Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
Tripsin İnhibitörü	Sigma	T6522
Percoll	Sigma	P4937
Poly-l-lizin	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
B27 suplementi	Invitrogen	17504-044
Antibiyotik-antimikotik solüsyonu	Sigma	A5955
Glutamin (Glutamax)	Invitrogen	35050-038

Çizelge 3.1. Sarf malzeme listesi (Devam).

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
Lösemi inhibitör faktörü (LIF)	Sigma	L5158
Anti- lösemi inhibitör faktör antikoru (α -LIF)	Sigma	L9152
Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	Sigma	N6009
Calcein	Calbiochem	206700
Lucifer Sarısı	Sigma	L0259
Floresan Dekstran (4K)	BioChemika	46944
Düşük Sıcaklıkta Jelleşen Agar	Sigma	A9045
Silikon elastomeri (Sylgard)	WPI-Dow-Corning	184
Cam tabanlı Petri kabı	WPI	FD35
Fosfat Tamponu (PB)	Sigma	P3288
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417
Paraformaldehit	Sigma	P6148
Anti- lösemi inhibitör faktör reseptör antikoru	Santa Cruz Biotechnology	H220
Alexa 488 tavuk anti-keçi IgG	Molecular Probes	A2467
Alexa 594 tavuk anti-tavşan IgG	Molecular Probes	A21442
Propidyum iyodür (PI)	ICN Biochemicals	255535-16-4
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma	A9418
Triton X	Merck	K26456203 924
Sodyum Azid	Sigma	S8032
Kriomatriks	Killik	05-9801
Poly-l lysin kaplı lam	Manzel-Glaser	08696
Tween 20	Merck	S95415 814

3.2.Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar

3.2.1.1. Diseksiyon Vasatı

RPMI 1640, içerisine %1 oranında glutamin ve aynı oranda antibiyotik-antimikotik solusyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Diseksiyon süresince vasat soğuk olarak kullanıldı.

3.2.1.2 Kültür vasatı

Neurobasal A (NBA), içerisine %1 glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik ve %2 oranlarında B27 supplementinin aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Kültür süresince vasat 37 °C sıcaklıkta kullanıldı.

3.2.2. Fareden arka kök ganglionlarının çıkarılması

Farelerin anestezisi intra peritoneal ketamin (40mg/kg) enjeksiyonu ile yapıldı ve ardından servikal transeksiyon ile öldürüldü. Çalışmanın amacına uygun olarak sadece lumbar 4-5 (L4-L5) arka kök ganglionları aseptik koşullarda, stereo mikroskop altında çıkarıldı. Ganglionlar, hücre kültürü yapılıncaya kadar soğuk RPMI 1640 vasatında bekletildi.

3.2.3. Hücre kültürü

Hücre kültürü basamakları:

1. Enzimatik parçalamaya kolajenaz ile başlandı (992,5µl NBA + 7,5 µl kolajenaz). Ganglionlar, 40 dakika etüvde inkübe edildi, ardından HBSS ile 3 kez yıkandı ve daha sonra bir diğer enzim olan tripsin (400 µl NBA + 200 µl Tripsin- 15 dk) ile enzimatik ayrıştırmaya devam edildi.
2. Mekanik ayrıştırma ganglionların tiriturasyonu ile yapıldı ve kültüre %1 oranında DNAz (6 µl) eklenerek 30 dk boyunca 50 Hz frekansta ajitasyonla etüvde inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra santrifüjle (120 g'de 3 dk) ayrışan hücreler çöktürüldü, süpernatant atıldı ardından pellet NBA (360 µl), FCS (40 µl) ve tripsin inhibitörü (30 µl) ile çözöldü. Plastik tüp içinde dipten yukarıya doğru %60, %35 ve %10'luk hazırlanan percoll gradienti üzerine hücre süspansiyonu kondu. 20 dakika 4000 rpm'de, 4 °C'de santrifüj ile nöronlar diğör hücrelerden ve doku kalıntılarından ayrıldı. Nöronları içeren percoll gradient tabakası bir başka tüpe aktarıldı, 120 g'de 3 dk santrifüjle hücreler dibe toplandı, süpernatantın büyük bir bölümü atıldı, geriye kalan içinde hücre peleti çözöldü ve nihai olarak 600 µl süspansiyon elde edildi.
 4. Elde edilen nöronlar, bir gün öncesinde oda sıcaklığında 2 saat %10 poly-l lizin ve ardından 37 °C'de 1 gece süresince % 0,001'lik laminin ile kaplanan 35 mm'lik Petri kaplarına ekildi (ekim öncesinde kültür kapları steril distile su ile yıkandı ve kurutuldu). Hücreler öncelikle NBA içinde 600 µl süspansiyon olarak ekildi; hücrelerin tabana yapışması için, 1 saat etüvde inkübasyondan sonra vasat 1,5 ml'ye tamamlandı. Kültürler %5 CO₂ ayarlı 37 °C'lik etüvde inkübasyona alındı.
- Hücre kültürü aşamaları şekil 3.1'de özetlenmiştir.



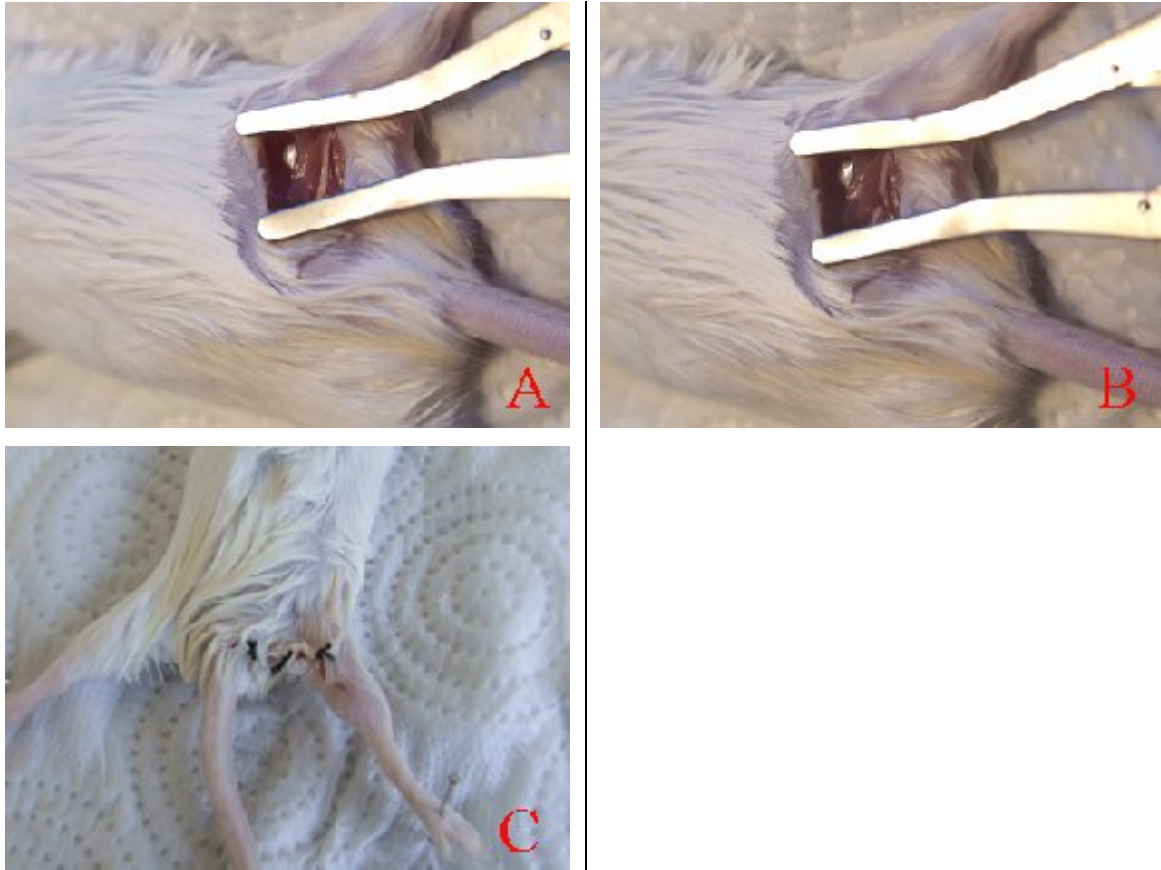
Şekil. 3.1. Arka kök ganglion kültürü basamakları.

3.2.4. Şartlandırma modelleri

Kullanılan şartlandırma modelleri Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

3.2.4.1. İn vivo şartlandırma deneyleri

Canlı hayvanda sağ siyatik sinir kesisi yapıldı. Bunun için ketamin ile anesteziye alınan hayvanın sağ uyluk arkasındaki bölge makasla traşlandı. %70’lik alkol spreyi ile bölge dezenfekte edildi. Bacak eksenine paralel olarak yapılan bir kesiyle önce deri açıldı, ardından kaslar aralanarak siyatik sinir açığa çıkarıldı ve yaylı bir makasla temiz bir kesi yapıldı (Şekil 3.2). Üç gün beklenerek şartlandırma gerçekleştirildi. Üçüncü günün sonunda siyatik sinire lif veren, bu nedenle şartlanmış nöronları içeren L4-L5 arka kök ganglionları aynı hayvanın sağ tarafında cerrahi metodlarla çıkarıldı ve kültür işlemlerinde kullanıldı.



Şekil. 3.2. İn vivo ortamda siyatik sinir kesisi. A. Derinin açılarak siyatik sinirin açığa çıkarılması. B. Siyatik sinirin kesilmesi. C. Açılan derinin dikişle kapatılması.

3.2.4.2. Şarhlı siyatik sinir parçalarıyla kokültür deneyleri

Farelere yukarıda anlatılan siyatik sinir kesisi uygulandı. Üç gün sonra kesilen siyatik sinirin 1cm'lik proksimal parçası anestezi altında kesilerek çıkarıldı. Bu parça daha küçük parçalara ayrılarak, düşük sıcaklıkta jelleşen eritilmiş %3 agaroz içine 37 °C'ye kadar soğutularak gömüldü ve karışım cam tabanlı kültür kabının bir köşesine tutturuldu (Şekil 3.3). 1 ml NBA ile 1 gün boyunca inkübe edildi. Birinci günün sonunda arka kök ganglionlarının kültürü yapıldı, hücreler 0,5 ml NBA ile agaroz içinde siyatik parçacıkları içeren petri kabına ekildi ve 48 saat boyunca hücreler takip edildi (Şekil 4.9).

Bu deneyin ikinci bölümünde; hücrelerin petri kabına ekiminden 24 saat sonra, laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomisi yapıldı ve 48 saat boyunca hücreler takip edildi (Şekil 4.26).

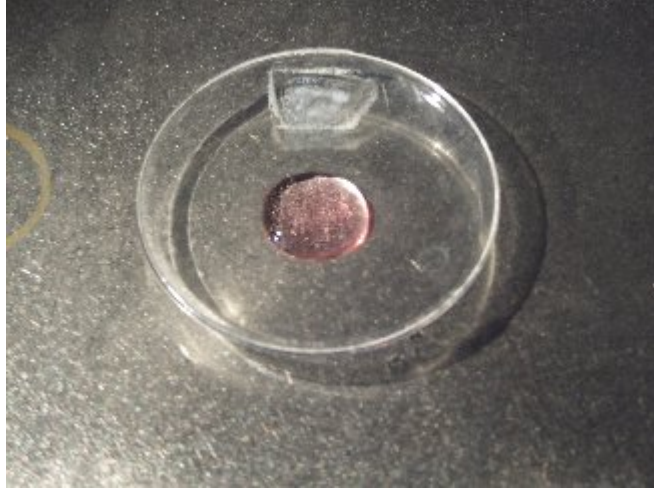


Şekil. 3.3. Petri kabı içinde agarozla gömülen siyatik sinir parçaları ve arka kök ganglion nöronları.

3.2.4.3. İn vitro şartlandırma deneyleri

L4-L5 arka kök ganglionlarının kültürleri yapılarak 1 ml'lik NBA içindeki süspansiyon silikon kaplı saat camına aktarıldı (Şekil 3.4). Hücre süspansiyonu içeren saat camı 3 gün boyunca etüvde (37 °C ve %5 CO₂) şartlandırıldı. 3. günün sonunda nöronlar iyice tiritüre edildikten sonra petri kabına aktarıldı. Hücreler 48 saat boyunca takip edildi (Şekil 4.12).

Bu deneyin ikinci bölümünde hücrelerin Petri kabına ekiminden 24 saat sonra laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomisi yapıldı ve hücreler 48 saat boyunca takip edildi.



Şekil 3.4. Silikon kaplı saat camında arka kök ganglion hücre süspansiyonu.

3.2.4.4. İn vitro şartlandırma modelinin etkinliğinin araştırılması

3.2.4.4.1. Calcein ve propidyum iyodür deneyi

3 gün boyunca 1 ml NBA içerisinde in vitro olarak şartlanan hücrelerin bu süre içerisinde hayatta kalma oranları hakkında fikir edinmek ve akson uzatıp uzatmadıklarını saptamak amacıyla calcein kullanıldı. Yukarıda anlatılan yöntemle nöronlar üç gün boyunca şartlandı. Üçüncü günün sonunda ortama calcein AM ve propidyum iyodür eklenerek 20 dakika etüvde inkübe edildikten sonra hücreler laser taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi.

3.2.4.4.2. Lucifer sarısı deneyi:

İn vitro olarak şartlanan hücrelerin Petri kabına aktarılmadan önce tiritürasyonları sırasında hasarlanıp hasarlanmadıklarını tespit etmek amacıyla lucifer sarısı tiritürasyondan önce hücre süspansiyonuna eklendi. Hücreler tiritüre edildikten sonra petri kabına ekildi ve 1 saat sonra görüntülendi.

3.2.4.4.3. Dekstran deneyleri

İn vitro olarak şartlanan hücrelerin Petri kabına aktarılmadan önce tiritürasyonları sırasında hasarlanıp hasarlanmadıklarını tespit etmek amacıyla kültürü

yapılarak ayrıştırılan hücreler 1 ml NBA ile üç gün saat camında etüvde inkübe edildi. Üçüncü günün sonunda hücrelerin endositozla dekstranı almalarını engellemek amacıyla hücre süspansiyonunun pH'ı 1 N'lik HCl ile 5.7'ye düşürüldü (Davoust ve ark., 1987). Tiritürasyondan önce dekstran eklenerek tiritüre edildi. Hücreler Petri kabına ekildikten 1 saat sonra laser taramalı konfokal mikroskopla görüntülendi.

Bu deneyin ikinci aşamasında ise in vitro şartlanan hücrelerle şartlanmayan hücreleri karşılaştırmak amacıyla L4-L5 arka kök ganglionları çıkarıldıktan sonra kollajenaz ile ayrıştırma aşamasından itibaren hücreler floresan dekstran ile muamele edildi. Hücreler Petri kabına ekildikten 1 saat sonra laser taramalı konfokal mikroskopla görüntülendi.

3.2.4.5. Tüm arka kök ganglionlarının (AKG) ayrıştırılmadan in vitro şartlandırılması

L4-L5 arka kök ganglionları çıkarılarak üç gün boyunca saat camında 1 ml NBA içerisinde ve etüvde inkübe edilerek şartlandırıldı. Üçüncü günün sonunda ganglionlar ayrıştırılarak kültürü yapıldı (ikinci aksotomi). Ekimden 1 saat sonra 48 saat boyunca akson rejenerasyonları gözlemlendi (Şekil 4.20) .

3.2.5. Normal (şartlanmamış) siyatik parçalarıyla kokültür deneyleri

Farelerin siyatik sinirleri çıkarıldı ve küçük parçalar halinde agaroz içinde kültür kabının bir köşesine tutturularak 1 ml NBA ile 1 gün boyunca etüvde bekletildi. Birinci günün sonunda L4-L5 arka kök ganglionlarının kültürü yapılarak; siyatik sinir parçacıkları içeren Petri kabına 0,5 ml NBA ile hücreler ekildi ve 48 saat boyunca görüntülendi.

Bu deneyin ikinci bölümünde hücrelerin Petri kabına ekiminden 24 saat sonra aksotomisi yapılarak 48 saat boyunca hücreler gözlemlendi (Şekil 4.23).

3.2.6. Aksotomi (akson kesisi) modelleri

Uygulanan aksotomi modelleri Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

3.2.6.1. PALM Mikrolaser sistemi

Bazı kültürlerde nöronların şartlandırma hasarı sonrası ikinci aksotomileri bir UV laser ünitesi içeren özel bir invert mikroskop sistemi (PALM Microbeam) ile gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Mikroskopta bulunan laser ünitesi 337 nm dalga boyunda, her biri 3 ns süren ve yaklaşık olarak 300 μ J enerji salan darbeler üretmektedir. Laser aksotomileri sırasında 63X kuru faz kontrast objektif (Achroplan N.A. 0.75, Zeiss Almanya) ve laser ışınlarını, mikroskobu ve mikroskoba bağlı olan CCD kamerayı kontrol eden bilgisayar sistemi kullanıldı.

Aksotomi, laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) kullanılarak yapıldı. Aksotomisi yapılacak olan nöronlar öncelikle zaman aralıklı mikroskop sistemi (Cell Observer-Zeiss) kullanılarak seçildi, pozisyonları belirlenerek kaydedildi. Kaydedilen pozisyonların koordinatları Petri kabı kapağına işaretlendi bu sayede laser mikrodiseksiyon mikroskobunda seçilen nöronlar daha kolay bulunabildi. Aksotomi için seçilen nöronların ve aksonlarının sağlıklı olmasına dikkat edildi. Akson uzunlukları en az 100 μ m olan nöronlar seçildi. Mümkün olan en düşük enerji düzeyinde (% 65) akson kesimi yapıldı. Kültür vasatında oluşabilecek pH değişikliklerini (alkali) önlemek amacıyla preparatlar aksotomi işlemi etüv dışında için 30 dakikadan fazla tutulmadı.



Şekil 3.5. PALM Mikrolaser Sistemi.

3.2.6.2. Şartlanan hücrelerin tripsinle ikinci aksotomi deneyleri

L4-L5 arka kök ganglion kültürü yapılarak laminin kaplı Petri kabına ekildi. Hücrelerin üç gün boyunca etüvde şartlanmaları sağlandı. Üçüncü günün sonunda kültürün vasatı uzaklaştırıldı. Kültüre 500 µl tripsin eklendi ve 25 dakika etüvde inkübe edildi. Tripsinin etkisiyle tabandan ayrılan hücreler taze vasatla yıkandı ve tripsin inhibitörü eklenerek kalan enzim aktivitesi inhibe edildi. Hücre süspansiyonu laminin kaplı yeni bir Petri kabına ekilerek vasat 1,5 ml'ye tamamlandı ve prepatlar 48 saat boyunca görüntülendi (Şekil 4.35).

3.2.7. LIF'in şartlandırma etkisindeki rolünün araştırılması

Bu bölümde yapılan deneyler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

3.2.7.1. Kontrol deneyleri

In vitro nöron şartlandırma deneyleri kültür vasatına LIF eklenerek (50 ng/ml) yapıldı. Üçüncü günün sonunda LIF uzaklaştırılarak laminin kaplı Petri kabına hücreler ekildi ve 48 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 4.38).

3.2.7.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri

LIF ile birlikte üç gün boyunca hücreler şartlandı üçüncü günün sonunda LIF uzaklaştırılarak hücreler laminin kaplı Petri kabına ekildi. Ekimden 24 saat sonra ikinci aksotomi yapılarak hücreler 48 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 4.44)

3.2.7.3. Şartsız hücre kültürü ve aksotomi deneyleri

L4-L5 arka kök ganglion kültürü yapılarak 50 ng/ml miktarında LIF ile birlikte 24 saat etüvde bekletildi 24 saatin sonunda aksotomi yapılan hücreler 48 saat takip edildi (Şekil 4.47).

3.2.7.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri

L4-L5 arka kök ganglionları çıkarılarak 50 ng/ml miktarında LIF ile birlikte üç gün boyunca şartlandırıldı. Üçüncü günün sonunda ganglionlar ayrıştırılarak kültürü

yapıldı (ikinci aksotomi). Ekimden sonra 48 saat boyunca akson rejenerasyonu gözlemlendi (Şekil 4.41).

3.2.7.5. LIF inhibisyon deneyleri

3.2.7.5.1. Kontrol deneyleri

L4-L5 arka kök ganglion kültürü yapıldı vasata 1 $\mu\text{l/ml}$ miktarında anti-LIF antikoru (αLIF) eklenerek silikon kaplı saat camında 3 gün boyunca şartlanmaları sağlandı. 3. günün sonunda αLIF uzaklaştırılarak, hücreler Petri kabına ekildi ve 48 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 4.50).

3.2.7.5.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri

L4-L5 arka kök ganglion kültürü yapıldı vasata 1 $\mu\text{l/ml}$ miktarında αLIF eklenerek silikon kaplı saat camında 3 gün boyunca şartlanmaları sağlandı. 3. günün sonunda αLIF uzaklaştırılarak hücreler ekildi. Bir gün sonra laser mikrodiseksiyon mikroskop sistemiyle bu nöronların uzayan aksonları kesildi 48 saat boyunca görüntü alındı (Şekil 4.53).

3.2.7.5.3. İn vitro şartlı hücrelere sürekli αLIF uygulaması deneyleri

L4-L5 arka kök ganglion kültürü yapıldı vasata 1 $\mu\text{l/ml}$ miktarında αLIF eklenerek silikon kaplı saat camında 3 gün boyunca şartlanmaları sağlandı. Üçüncü günün sonunda hücreler Petri kabına aktarıldı, eksilen αLIF tamamlanarak 48 saat boyunca görüntüleme yapıldı (Şekil 4.56).

3.2.7.5.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri:

L4-L5 arka kök ganglionları çıkarılarak ayrıştırılmadan 1 $\mu\text{l/ml}$ miktarında αLIF ile birlikte 3 gün boyunca şartlandırıldı. Üçüncü günün sonunda ganglionlar ayrıştırılarak kültürü yapıldı (ikinci aksotomi). Ekimden sonraki 48 saat boyunca akson rejenerasyonu görüntülendi (Şekil 4.59).

3.2.7.6. LIF ile NGF arasındaki karşılıklı ilişkinin araştırılması deneyleri

Ayrıştırma aşamaları sırasında kullanılan tüm vasatlarda 50 ng/ml NGF bulundurularak kültürü yapılan nöronlar 3 gün boyunca in vitro şartlandırıldılar. Üçüncü

günün sonunda hücreler Petri kabına ekildiler. Ekimden 1 saat sonra preparatlar paraformaldehid ile tesbit edilerek LIF ve LIF reseptör immünohistokimya işlemlerinden geçirildiler.

Çizelge 3.2. Deney modelleri.

Şartlandırma Modelleri	Aksotomi Modelleri	Şartlandırmaya LIF Etkisinin Araştırılması Modelleri
1. İn vivo şartlandırma deneyleri	1. PALM mikrolaser sistemi ile aksotomi	1. Kontrol deneyleri
2. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültür deneyleri	2. Tripsin muamelesi ile ikinci aksotomi	2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri
3. İn vitro şartlandırma deneyleri		3. Şartsız hücre kültürü ve aksotomi deneyleri
İn vitro şartlandırmanın etkinliğinin araştırılması deneyleri		4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri
a. Calcein deneyleri		5. LIF inhibisyon deneyleri
b. Lucifer Sarısı deneyleri		a. Kontrol deneyleri
c. Dekstran deneyleri		b. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyleri
4. Normal (şartlanamış) siyatik parçalarıyla kokültür deneyleri		c. İn vitro şartlı hücrelere sürekli α -LIF'in uygulaması deneyleri:
5. Arka kök ganglionlarını bütün olarak in vitro şartlandırma deneyleri		d. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyleri
		6. LIF ile NGF arasındaki karşılıklı ilişkinin araştırılması deneyleri

3.2.8. İmmunohistokimya deneyleri

Bu başlık altında yapılan deneyler Çizelge 3.3’de özetlenmiştir.

3.2.8.1. Tespit işlemi

İmmunohistokimyasal çalışmalar sırasında iki farklı tespit yöntemi kullanılmıştır. İlk yöntemde kültür vasatı uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında fosfat tuz tamponu (PBS) ile 2 defa yıkandı. Ardından hücreler yine oda sıcaklığında % 4’lük taze paraformaldehit ile 15 dakika boyunca tespit edildi. PBS ile 2 defa yıkama yapıldıktan sonra Petri kabına blok solusyonu (%3 BSA, %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid, %1 tavuk serum ile hazırlandı) eklenerek 30 dakika buzdolabında bekletildi.

İkinci yöntemde ise tespit işlemi arka kök ganglionlarına bir bütün olarak uygulandı ve ardından alınan kesitlerde immünohistokimyasal boyama yapıldı. Farelerin sırt bölgesi kostalarla birlikte çok hızlı bir şekilde çıkarıldı ve %4’lük soğuk paraformaldehitte 1 saat bekletildikten sonra PBS ile yıkandı. Ardından L4-L5 arka kök ganglionları mikroskop altında çıkarıldı ve %30’luk süktroz çözeltisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün ganlionlardan dondurup kesit alma (frozen section) tekniği ile kesitler alındı. Öncelikle arka kök ganglionları özel bir matriks (Kriomatriks Killik 05-9801) içine gömüldü. Leica CM 1900 model mikrotomla, -20 C⁰’de 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler poly-l-lizin kaplı özel lamplara (Manzel) tutturuldu. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çevrildikten sonra blok solüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

3.2.8.2. Primer antikor uygulaması

İki farklı primer antikor kullanıldı. α -LIF ve α -LIFR β antikorları sulandırma solusyonu (%3 BSA, %1 tavuk serum, %0,1 sodyum azid, %0,1 Tween 20) ile 1/100 olarak hazırlandı. Hem hücreler hem de kesitler 50 µl α -LIF, 40 µl α -LIFR β ve 100 µl PBS ile bir gece buzdolabında nemli bir kutu içinde bekletildi. Primer antikor uygulamasından sonra 5 kez PBS ile yıkama yapıldı.

3.2.8.3. Sekonder antikor uygulaması

Alexa 488 tavuk anti-keçi IgG'si ve Alexa 594 tavuk anti-tavşan IgG'si olmak üzere iki farklı sekonder antikor aynı anda kullanıldı. Sekonder antikorlar kullanılmadan önce 1/100 oranında sulandırma solusyonuyla sulandırıldı ve preparatların üzerine her birinden 50 µl kondu. Buzdolabında, nemli bir kutuda 3 saat inkübasyondan sonra preparatlar 5 kez PBS ile yıkandı ve görüntülenmek üzere lamel ile kapatıldı.

3.2.8.4 İmmunohistokimya deney tanımları

İki farklı grupta immunohistokimya deneyleri yapıldı. İlk grup deneylerde arka kök ganglionlarının kesitleri LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı. İkinci grup immunohistokimya deneyleri ise ayrıştırıldıktan sonra petri kabına ekilen arka kök ganglion nöronları ile yapıldı.

3.2.8.4.1. Arka kök ganglion kesitlerinde yapılan immunohistokimya deneyleri

Bu çalışmada dört farklı grup deney yapıldı. Öncelikle kontrol grubu deneyde L4-L5 arka kök ganglionları herhangi bir in vivo şartlandırma çalışması olmaksızın çıkarıldı, kesitleri alınarak LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı. Siyatik sinirleri kesilerek farklı sürelerde in vivo şartlandırılan arka kök ganglion kesitlerinin immunohistokimyası yapıldı. Sırasıyla 3 gün, 3 saat ve 1 saat in vivo ortamda şartlandırılan L4-L5 arka kök ganglionları çıkarılarak kesitleri alındı, LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı.

3.2.6.4.2. Hücre kültürleriyle yapılan immunohistokimya deneyleri

Bu çalışmada ise beş farklı grup deney yapıldı. Öncelikle herhangi bir şartlanma modeli uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı. Siyatik sinirleri kesildikten sonra in vivo ortamda 3 gün şartlandıktan sonra ayrıştırılan arka kök ganglion nöronlarının LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra Petri kabına alınan nöronların ve anti-LIF ile in vitro olarak şartlandırılan nöronların LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı. İn vitro ortamda bütün olarak 3 gün şartlandıktan sonra ayrıştırılarak Petri kabına ekilen nöronların LIF ve LIF reseptör immunohistokimyası yapıldı.

Çizelge 3.3. İmmunohistokimyasal deney modelleri.

Arka kök ganglion kesitlerinde yapılan immunohistokimya deneyleri	Hücre kültürleriyle yapılan immunohistokimya deneyleri
1. Arka kök ganglion kesitlerinin LIF ve LIF reseptör boyaması	1. Kontrol grubu hücrelerin LIF ve LIF reseptör boyaması
2. 3 gün in vivo ortamda şartlandırılan arka kök ganglion kesitlerinin LIF ve LIF reseptör boyaması	2. İn vivo ortamda şartlanan hücrelerin LIFve LIF reseptör boyaması
3. İn vivo ortamda 3 saat şartlanan arka kök ganglion kesitlerinin LIF ve LIF reseptör boyaması	3. İn vitroda şartlanan hücrelerin LIF ve LIF reseptör boyaması
4. İn vivo ortamda 1 saat şartlanan arka kök ganglion kesitlerinin LIF ve LIF reseptör boyaması	4. Anti lıf ile in vitroda şartlanan hücrelerin LIF ve LIFreseptör boyaması.
	5. Bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan arka kök ganglion nöronlarının LIF ve LIF reseptör boyaması

3.2.9. Mikroskopik görüntüleme ve görüntü analizleri

3.2.9.1. Zaman aralıklı mikroskopi (Time Lapse) ile görüntüleme

Hücre kültürüyle in vitro ortama alınan nöronlar zaman aralıklı mikroskopi sistemiyle (Cell Observer-Zeiss) gözlendi (Şekil 3.6). Çalışma süresince görüntüleme aralığı 15 dakika olarak belirlendi ve nöronlar 48 saat boyunca sürekli olarak görüntülendi. Görüntüleme sırasında 10X büyütme bir objektif kullanıldı.

Sistem motorize bir invert mikroskop (Axiovert 200M) ve tüm fonksiyonlar kontrol edilip programlanabildiği bilgisayar ve yazılımından oluşmaktadır. Mikroskop üzerinde bulunan dijital kamera ile alınan görüntüler bilgisayar ortamına aktarılabilir. Tablo üzerinde bulunan ve preparatın içine yerleştirildiği inkübasyon kutusu destek üniteler sayesinde hücreler için fizyolojik şartları sağlayacak atmosfer şartlarını sağlamaktadır (37 °C, %5 CO₂, nem). Sistemde kullanılan bilgisayar programı (Axiovision 3.1) mikroskopun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında

düzenlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu programla preparatların x, y, z koordinatları ile birlikte çeşitli pozisyonlar kaydedilebilir ve; görüntü alma aralığı, süresi ile görüntü özellikleri (renk ayarı, parlaklık, çözünürlük gibi) ayarlanabilir. Görüntü alınırken ve iki görüntü alımı arasında objektifler, filtreler ve ışık ayarı gibi çalışmanın özelliğine göre daha önce kaydedilen bu özellikler otomatik olarak değiştirilebilir. Ayrıca bu programda hücreleri canlı olarak bilgisayar ortamında izleme olanağı da bulunmaktadır. Görüntülenen pozisyonlar özel bir formatla (zvi) depolanır ve daha sonra bu görüntüler birleştirilerek film haline getirilebilir (Öztürk ve Erdoğan, 2004).

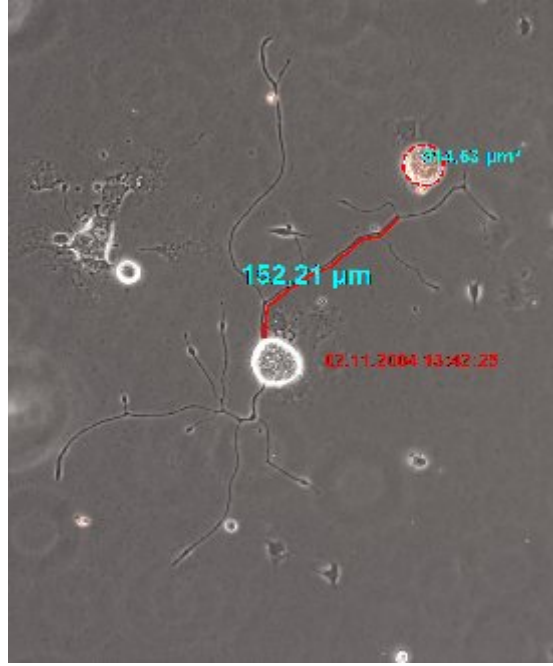


Şekil 3.6. Zaman aralıklı mikroskopi sistemi.

3.2.9.2. Görüntü analizleri

Görüntü analizleri, her saat için akson uzunlukları ölçülerek yapıldı (Şekil 3.7). Akson uzama hızları hesaplanarak hız profilleri çıkarıldı. Hız birimi olarak μm kullanıldı. Genel akson rejenerasyon aktivitesini daha iyi ifade edebilecek bir gösterge olarak “rejenerasyon indeksi” hesaplandı. Bu değer, inkübasyonun başlangıcında görüntülenmeye başlanan nöronlardan içinde analizi yapılan zaman aralığında rejenerasyon yapanların oranı ile aynı zaman aralığında rejenere olan tüm aksonların

ortalama uzama hızı çarpılarak bulundu ([rejenerasyon gösteren nöron sayısı/toplam nöron sayısı] x ortalama rejenerasyon hızı). Rejenerasyon aktivitesi birimi bulunmamaktadır. Saatlik olarak hesaplanan uzama hızları daha sonra analiz kolaylığı için üçer saatlik ortalamalara dönüştürülerek istatistiksel analize tabi tutuldu. Her deney grubu için en az 30 nöronun akson uzaması analiz edildi. Uzunluk birimi olarak μm kullanıldı.



Şekil 3.7. Akson uzunluğu ve nöron alanı ölçümü.

3.2.9.3. Laser taramalı konfokal mikroskopta immunohistokimyasal preparatların görüntülenmesi

İmmunohistokimyasal olarak boyaması yapılan preparatlar confocal laser taramalı mikroskop ile görüntülendi (Zeiss LSM 510 META) (Şekil 3.8). Görüntülemeler için argon (488 nm) ve helyum-neon (543 nm) laserleri kullanıldı. Çoğu preparatların görüntülenmesinde immersiyon yağlı 40x ve 63x büyütmeli objektifler kullanıldı.



Şekil 3.8. Laser taramalı konfokal mikroskop sistemi.

3.2.9.4. Floresan görüntü analizleri

Laser taramalı konfokal mikroskopa alınan floresan görüntüler LSM 3.0 yazılımı ile analiz edildi. Analizlerde floresan parlaklık ve hücre alan ölçümleri yapıldı.

3.2.10. İstatistiksel analizler

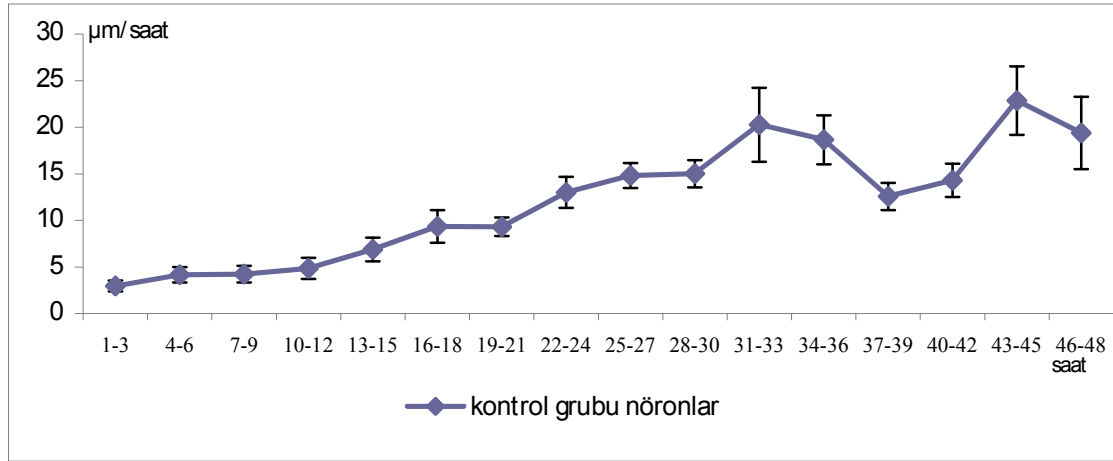
İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılımı ile gerçekleştirildi. Öncelikle verilerin dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Bunun sonucuna göre gruplar arası karşılaştırmalar için parametrik ve parametrik olmayan testler kullanıldı. Bunlar LSD posthoc karşılaştırmasıyla birlikte ANOVA, Student t-testi, Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleriydi. Ayrıca çeşitli gruplar arasındaki ilişkileri irdelemek için Pearson korelasyon analizi ve gruplar arasındaki orantısal farkları analiz etmek için ki-kare testi yapıldı.

4.BULGULAR

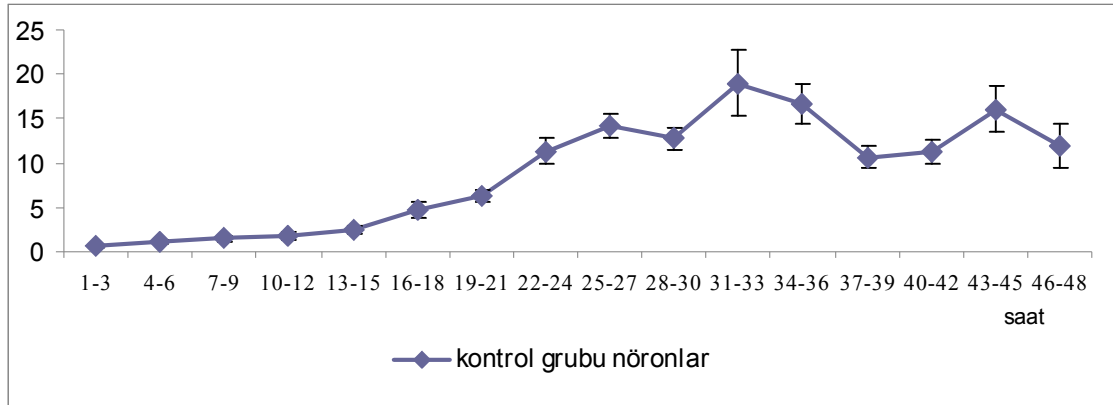
4.1. Rejenerasyon Hız ve Aktivitesinin Zamansal Analizi

4.1.1. Kontrol grubu

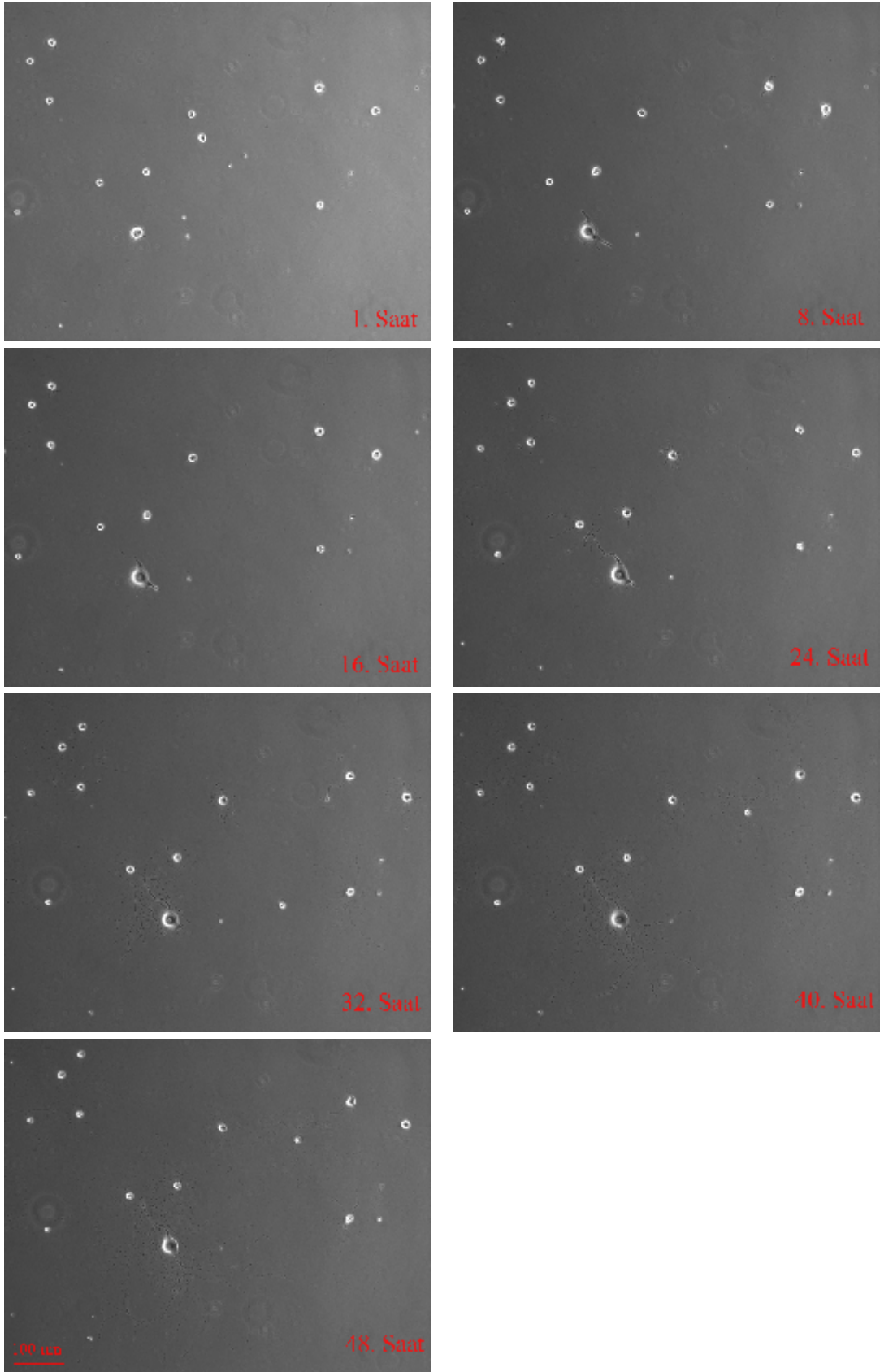
Herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu nöronların rejenerasyon hızlarının 33. saate kadar kademeli olarak arttığı, 33 ile 39. saatler arasında bir azalma olduğu, ikinci hız artışının 40 ile 45. saatler arasında meydana geldiği, en yüksek rejenerasyon hızına 45. saatte ulaştığı ve 45. saatten sonra bu hızın tekrar azaldığı belirlendi. (Şekil 4.1). Rejenerasyon aktivitesinin ise 33. saate kadar kademeli bir artış gösterdikten sonra 48. saate doğru düzensiz bir azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Kontrol grubu nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



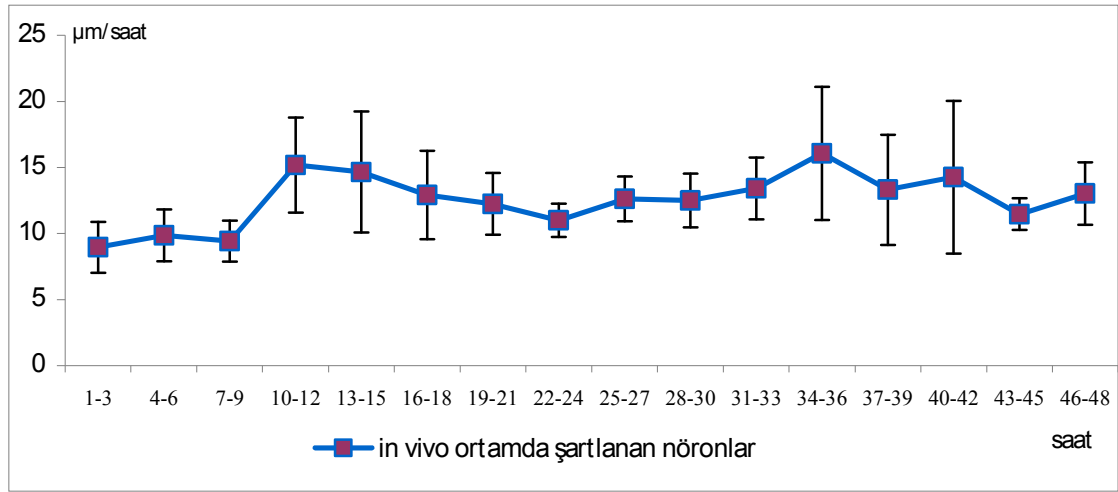
Şekil 4.2. Kontrol grubu nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



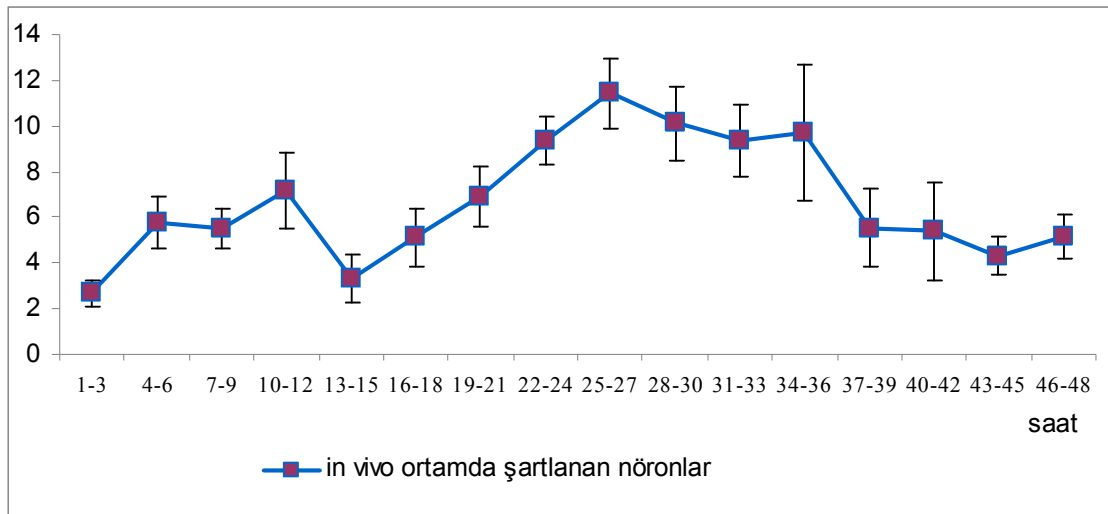
Şekil 4.3. Kontrol grubu nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.2. İn vivo şartlanma deneyi

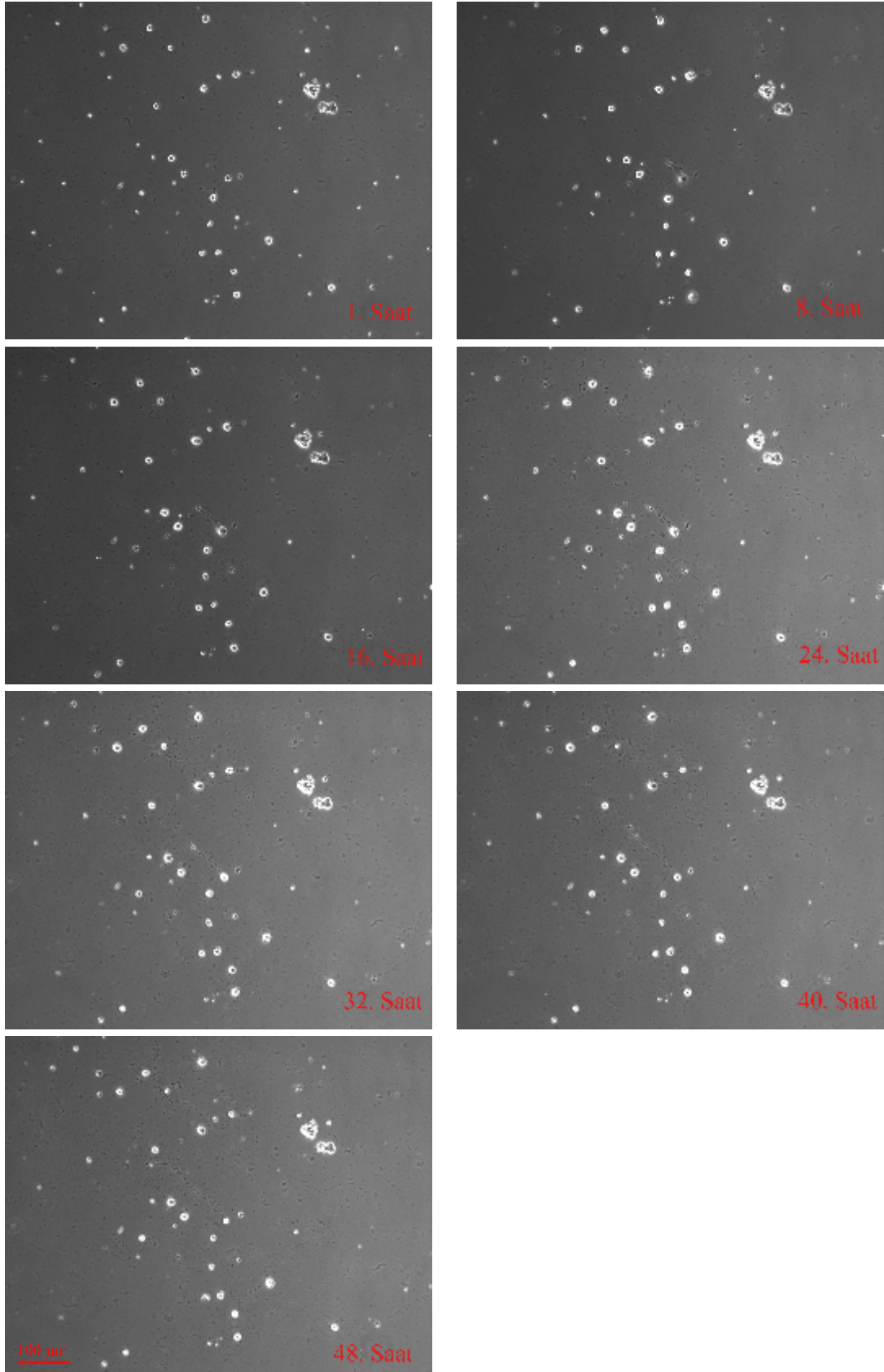
Siyatik sinir kesisinden 3 gün sonra çıkartılıp ayrıştırılan arka kök ganglion nöronlarının rejenerasyon hızlarının ilk 12 saatte arttıktan sonra 36. saate kadar daha stabil kaldığı ve 48. saate doğru düzensiz bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil.4.4). Bu gruptaki nöronların rejenerasyon aktivitesinin ise 10. saate kadar düzensiz bir artış sergilediği, aktivitenin 14. saate kadar azaldıktan sonra hızlı bir artışa geçerek en yüksek aktivite değerine 25. saatte ulaştığı ve 25. saatten sonra aktivitenin düzensiz bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil. 4.4. İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



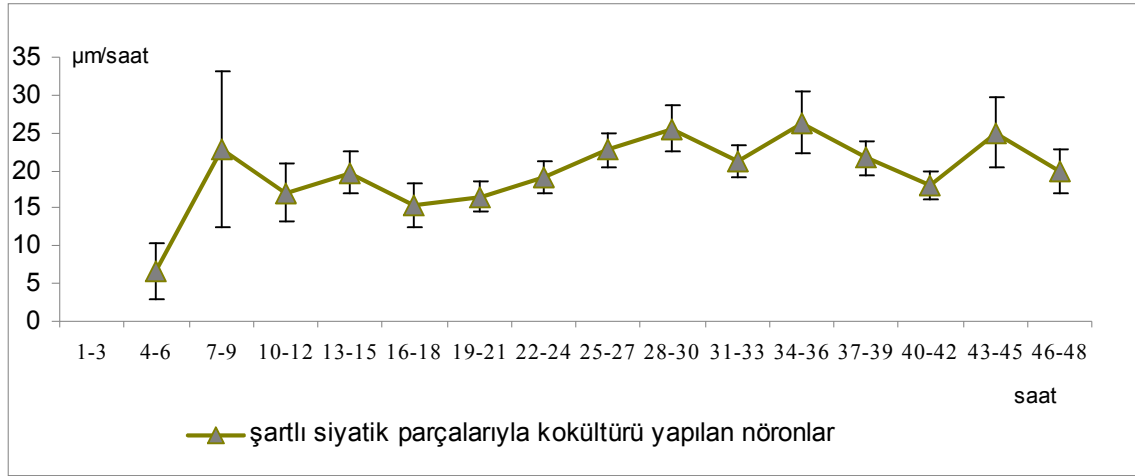
Şekil. 4.5. İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



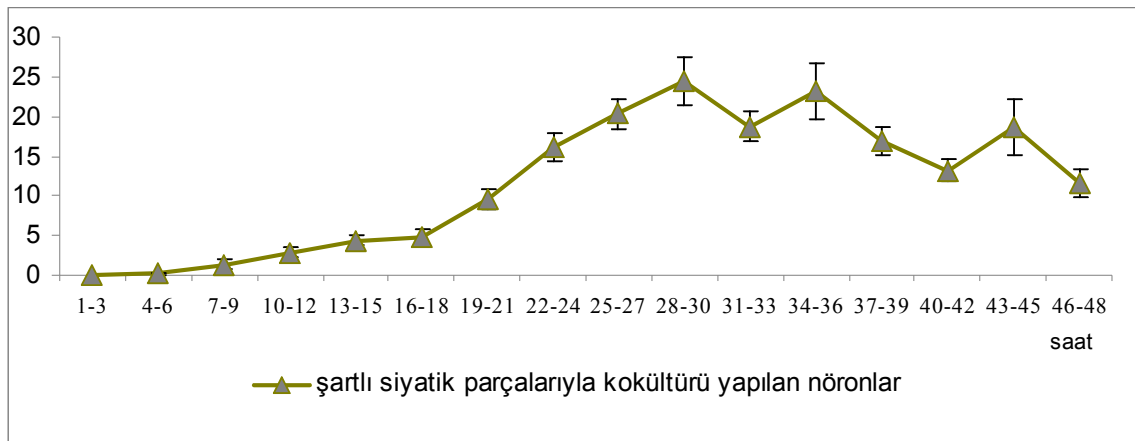
Şekil 4.6. İn vivo ortamda şartlanan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.3. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültür deneyi

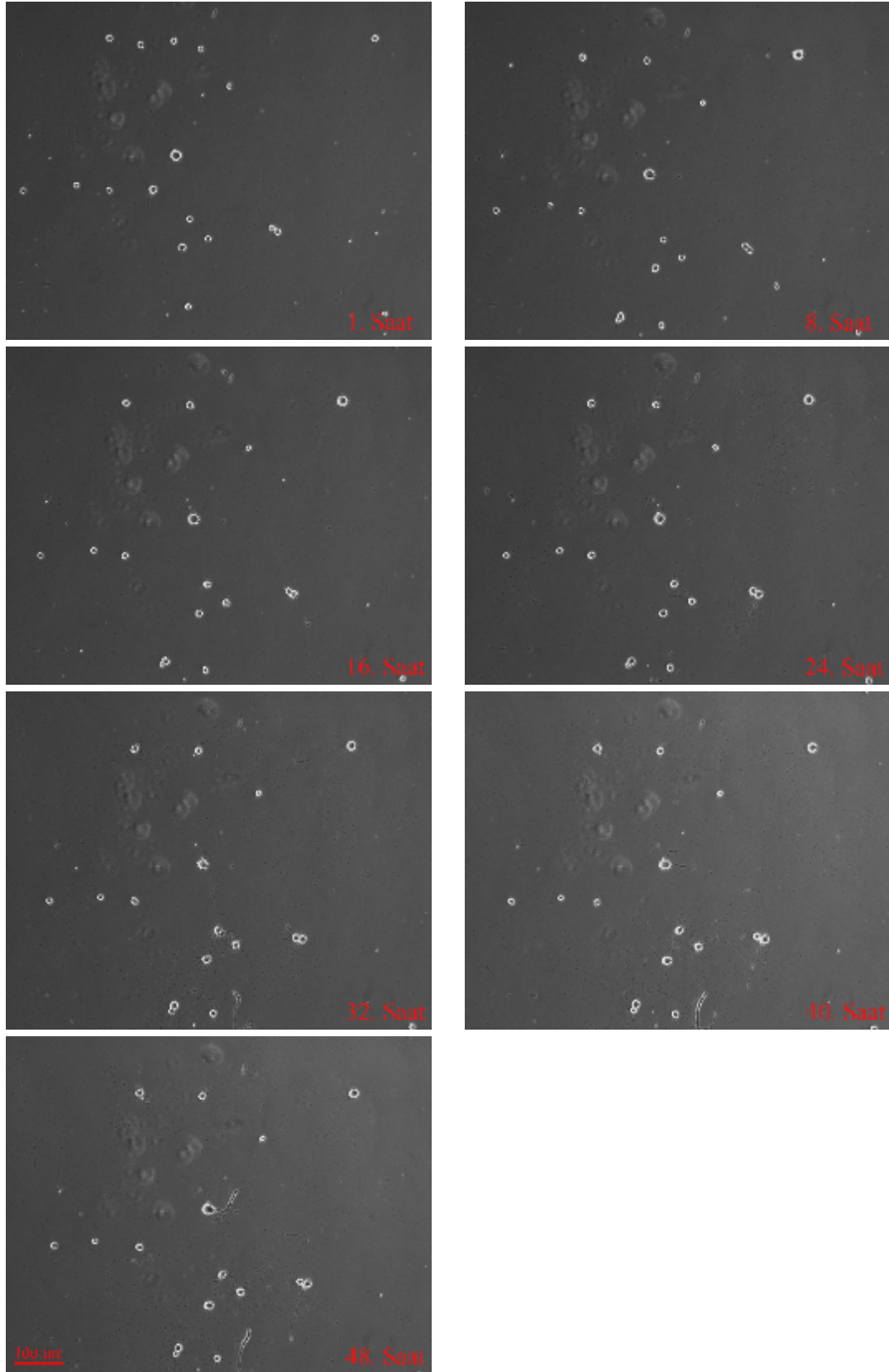
Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızının ilk 9 saatte hızlı bir artıştan sonra 30. saate kadar önce azalan daha sonra kademeli olarak artan bir davranış sergilediği, 48. saate doğru ise azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7). Bu grupta ilk 24 saati aşkın bir süre boyunca düzenli bir şekilde artan bir rejenerasyon aktivitesi gözlemlendi. İkinci 24 saat boyunca daha stabil, ancak azalma eğiliminde olan bir aktivite izlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



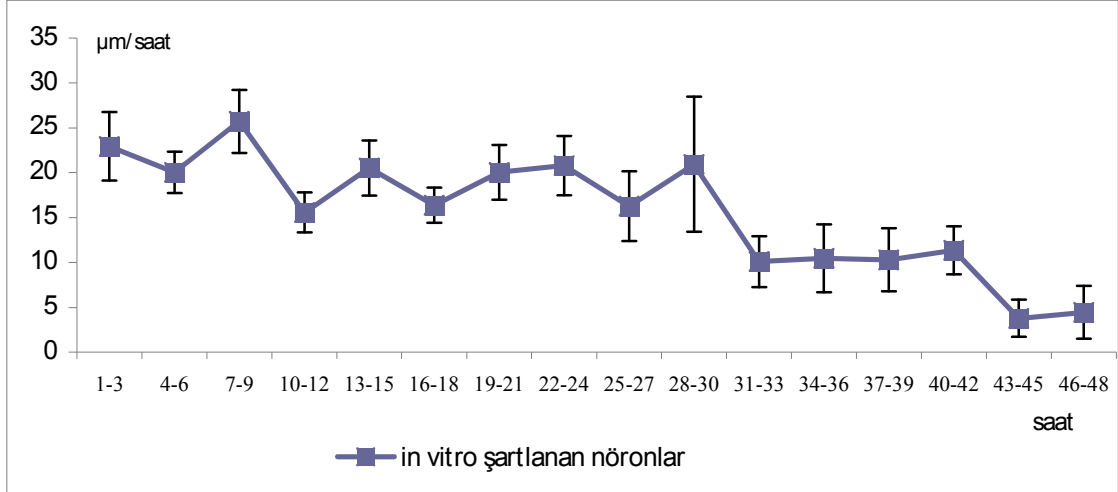
Şekil 4.8. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



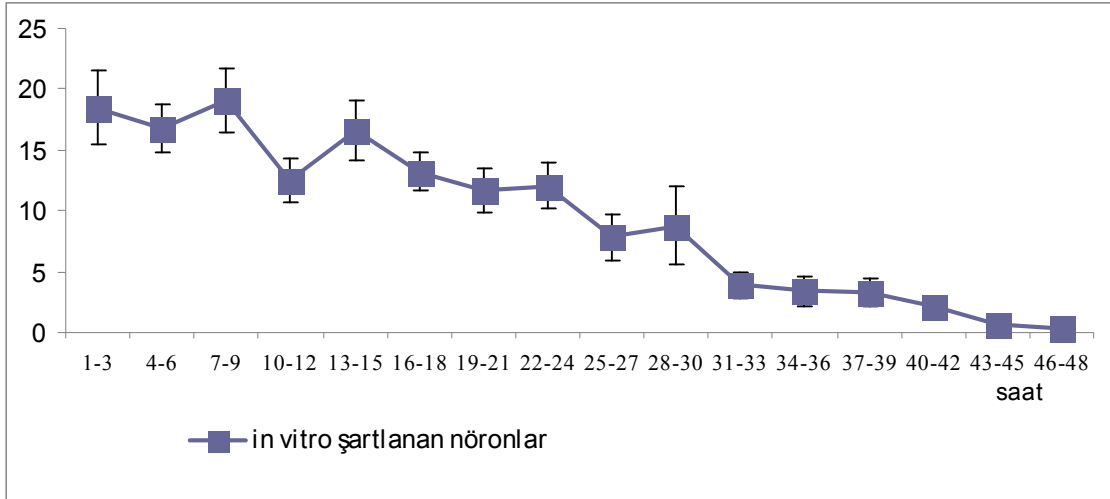
Şekil 4.9. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.4. İn vitro şartlandırma deneyi

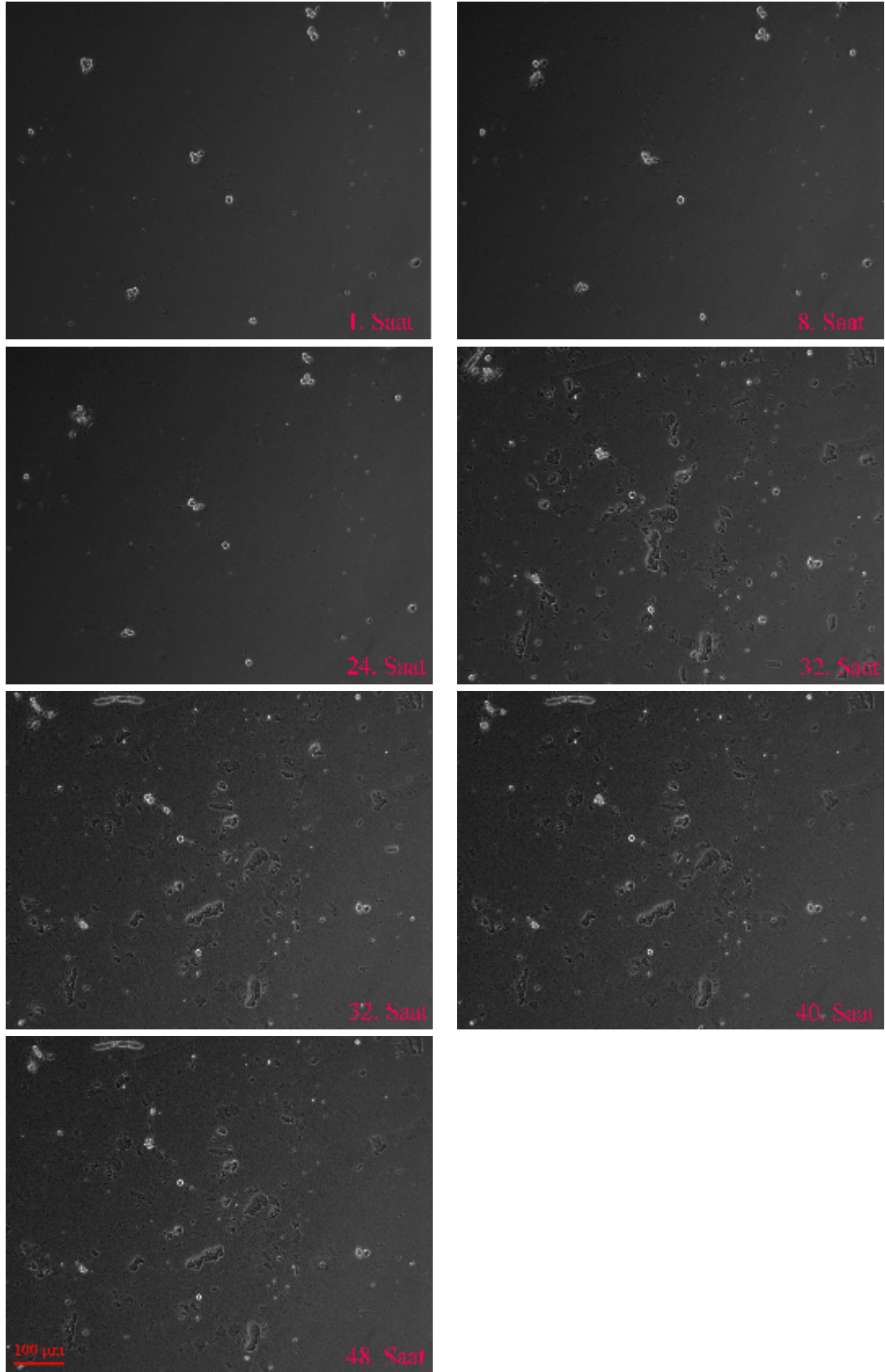
İn vitro şartlanan nöronların ilk saatlerde rejenerasyona hızlı başladıktan sonra 48. saate kadar bu hızın düzensiz bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.10). Rejenerasyon aktivitesinin ise ilk saatlerde yüksek olduğu daha sonra bu aktivitenin 48. saate doğru kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. İn vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



Şekil 4.11. İn vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.

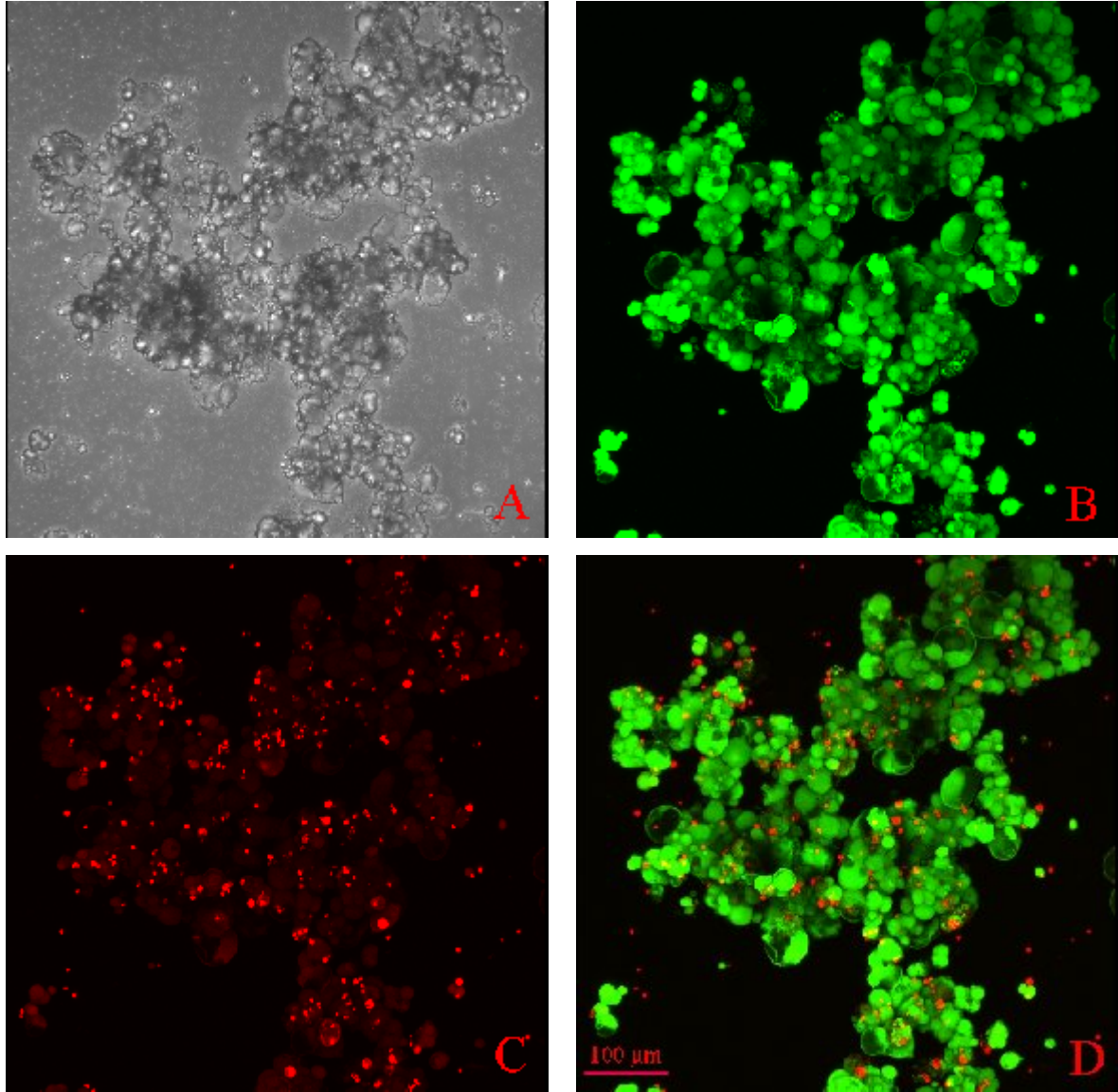


Şekil 4.12. İn vitro ortamda şartlanan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.4.1. İn vitro şartlandırma deney modelinin etkinliğinin araştırılması

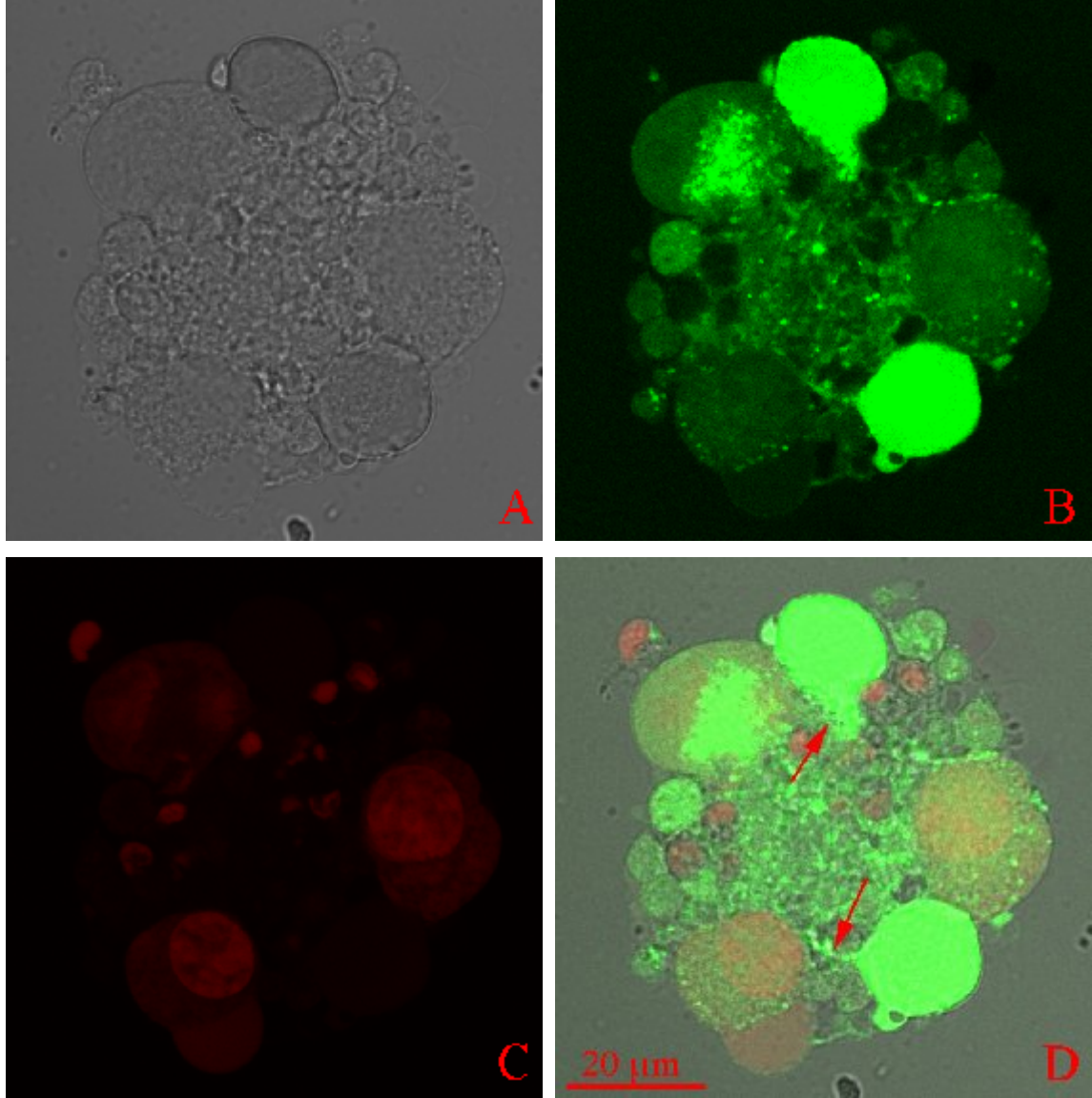
4.1.4.1.1. Calcein ve propidyum iyodür deneyi

İn vitro ortamda şartlanma sırasında bir araya gelerek küme oluşturan arka kök ganglion nöronları calcein ve PI ile boyanarak canlı ve ölü hücreler görüntülendi. Nöron grubunda kuvvetli calcein boyanması (yeşil) yüksek canlılığa işaret ediyordu; PI ile kırmızı renge boyanan çekirdeklerin genellikle çok küçük olduğu ve muhtemelen satellit hücrelerine ait olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Laser taramalı konfokal mikroskopta canlı olarak görüntülenen in vitro şartlanmış nöronların transmisyon (A), calcein (B), PI (C) ve calcein + PI (D) görüntüleri. Yeşil renk, calceinle boyanmış canlı hücreleri, kırmızı ise ölü hücrelerin çekirdeklerini işaretlemektedir.

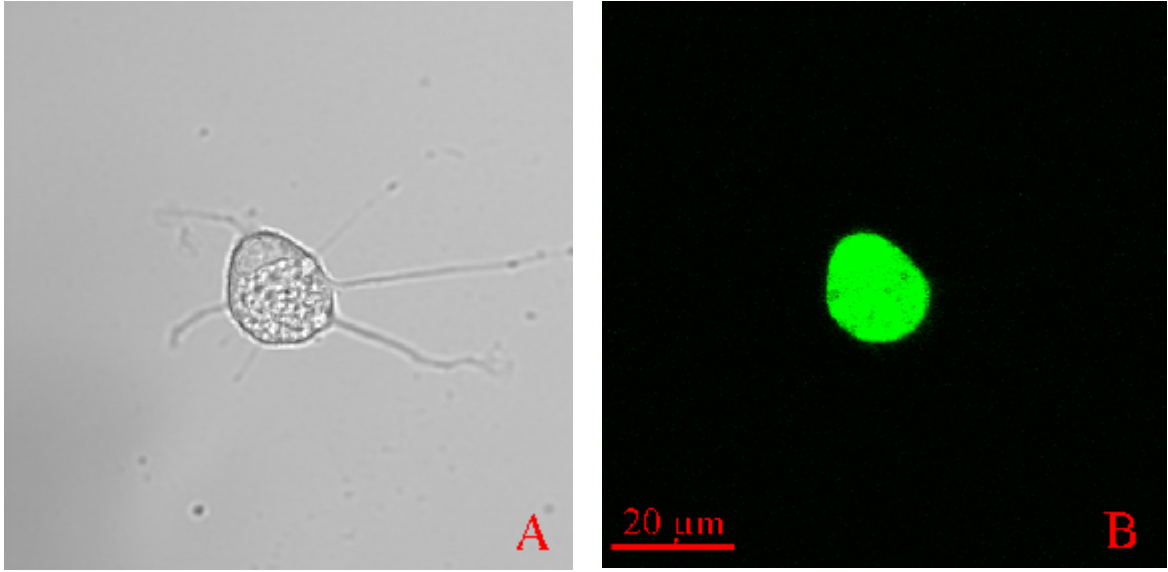
Girdiği hücrelerin her tarafına nüfuz eden calcein canlı hücrelerin aksonal uzantılarını da görünür hale getirmektedir. İncelenen preparatlarda, küme halindeki nöronların yaklaşık her 100 tanesinden birinin komşu nöronların üzerine akson uzattığı gözlemlendi (Şekil 4.14). Bu, daha sonra ekilecek ve 48 saat boyunca görüntülenecek bu nöronların çok az bir bölümünün ekim için kümelerin dağıtılması sırasında aksotomi olduğunu gösterdi.



Şekil 4.14. Laser taramalı konfokal mikroskopta canlı olarak görüntülenen in vitro şartlanmış nöronların transmisyon (A), calcein (B), PI (C) ve calcein + PI (D) görüntüleri. Oklar, iki nöronun kümedeki diğer nöronlar üzerine uzattığı aksonları gösteriyor.

4.1.4.1.2. Lucifer sarısı deneyi

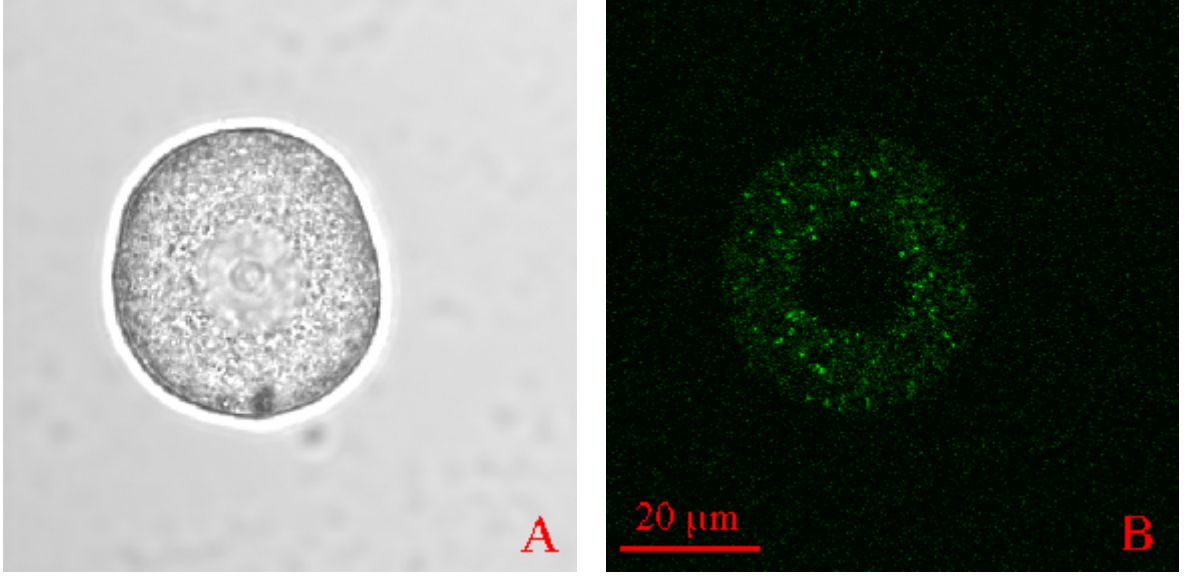
İn vitro olarak şartlanan hücrelerin Petri kabına aktarılmadan önce tiritürasyonları sırasında hasarlanıp hasarlanmadıklarını, dolayısıyla hesaba katılmayan bir aksotomiye uğrayıp uğramadığını tespit etmek amacıyla lucifer sarısı boyaması yapıldı. Sonuç olarak aksonları hasarlanan nöronların lucifer sarısı boyasını hücre içine alarak boyandıkları gözlemlendi (Şekil.4.15).



Şekil 4.15. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra Petri kabına alınarak boyanan bir nöronun transmisyon (A) ve Lucifer sarısı (B) görüntüleri.

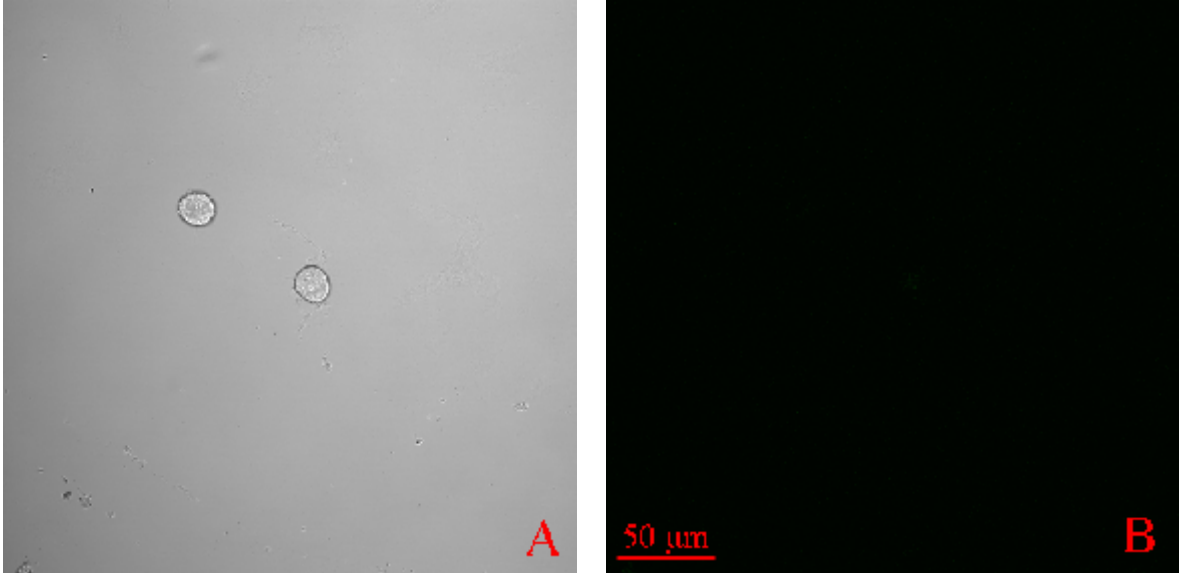
4.1.4.1.3. Floresan dekstran deneyleri

Lucifer sarısı deneylerindeki benzer şekilde kültür için ayrıştırma işleminin ilk basamağından itibaren uygulandığında nöronların bu maddeyi aldığı gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Arka kök ganglion ayrıştırması sırasında floresan dekstran alan bir nöronun transmisyon (A) ve floresan dekstran (B) görüntüleri. Bu deneylerde nöronlar az miktarda dekstran aldılar.

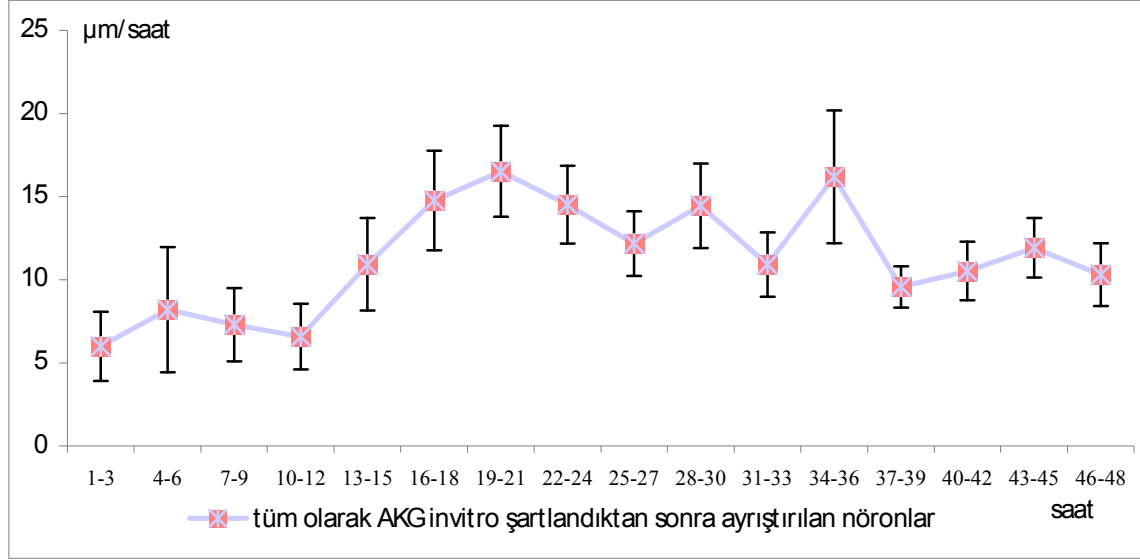
Hücrelerin dekstranı endositoz ile almış olabileceği ihtimalini test etmek için asidik vasatla yapılan deneylerde nöronların boya almadığı gözlemlendi (Şekil 4.17).



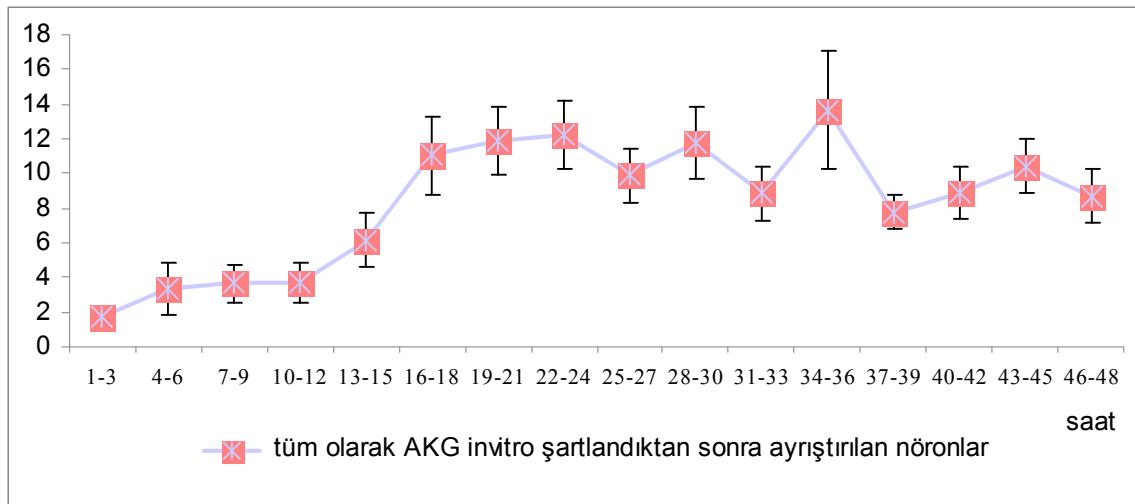
Şekil 4.17. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra vasatı asidik yapılarak floresan dekstran eklenen ve ardından ekimi yapılan nöronların transmisyon (A) ve floresan dekstran (B) görüntüleri. Bu deneyde nöronlar dekstranla boyanmadılar.

4.1.5. Tüm arka kök ganglionlarının (AKG) ayrıştırılmadan in vitro şartlandırılması deneyi

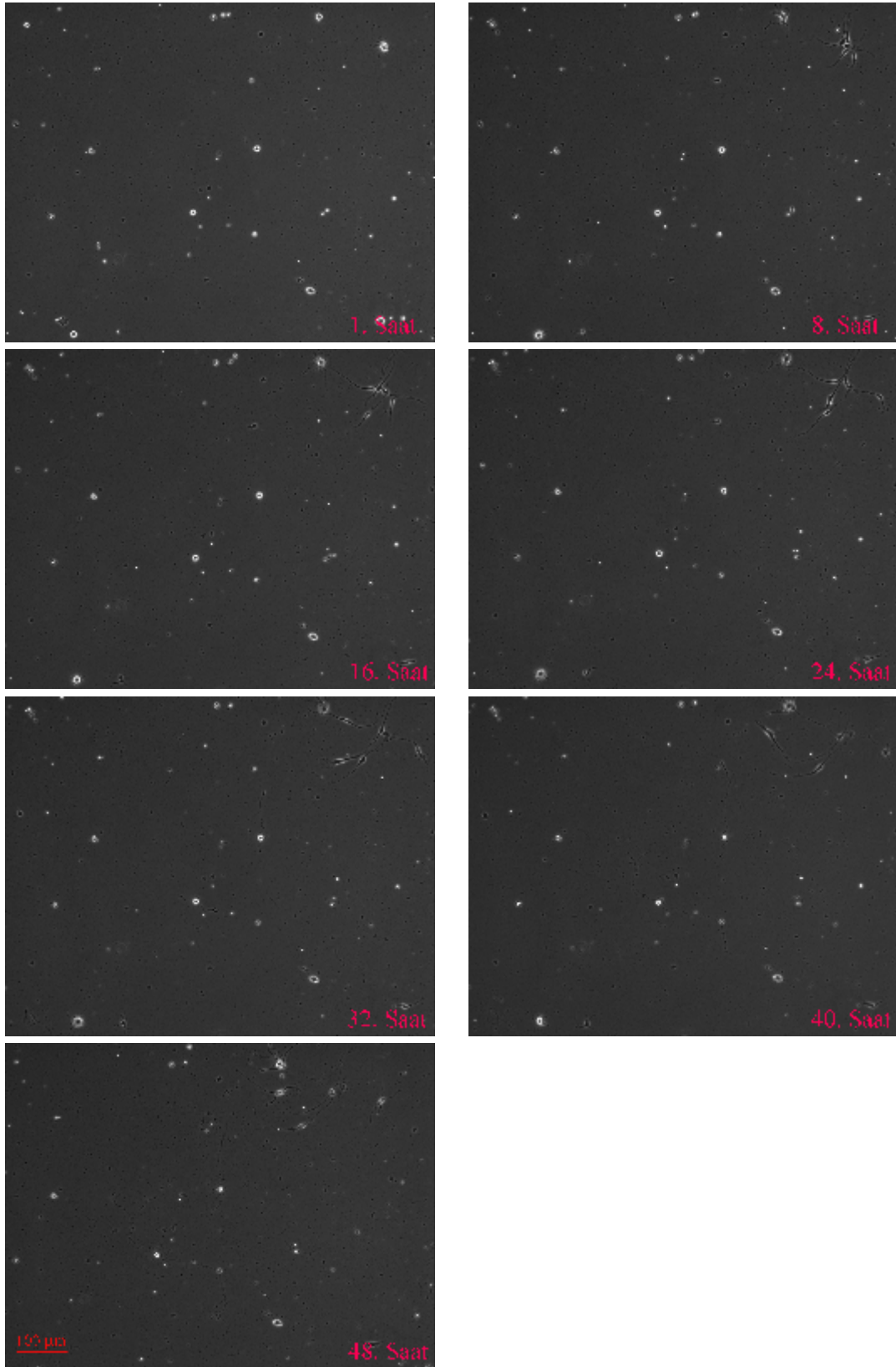
Tüm arka kök ganglionlarının in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon hız ve aktivitesi benzer bir davranış sergiledi. Hız ve aktivitenin ilk 24 saate kadar kademeli olarak arttığı ikinci 24 saatte ise düzensiz bir azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18, 4.19).



Şekil 4.18. Tüm olarak arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon hızı grafiği.



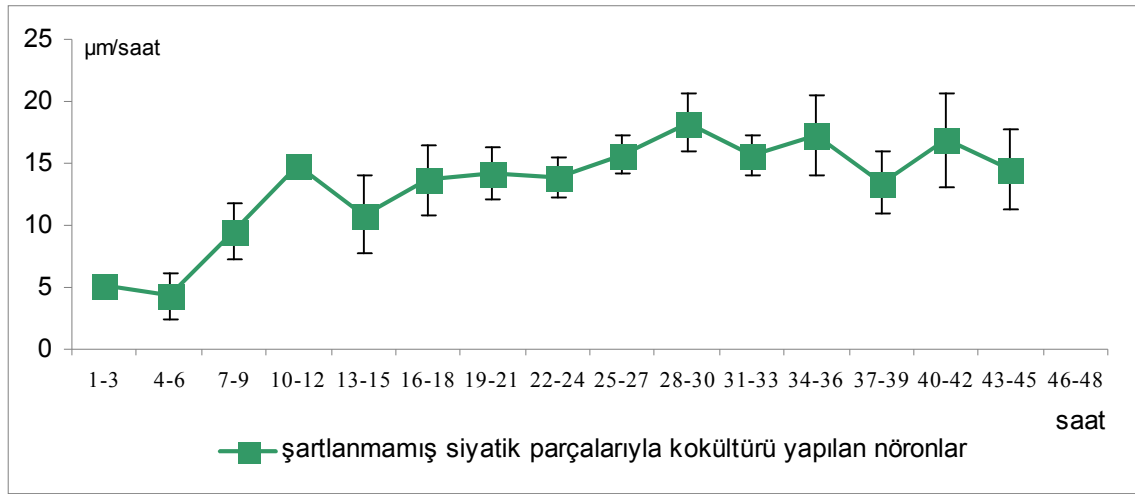
Şekil 4.19. Tüm olarak arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.



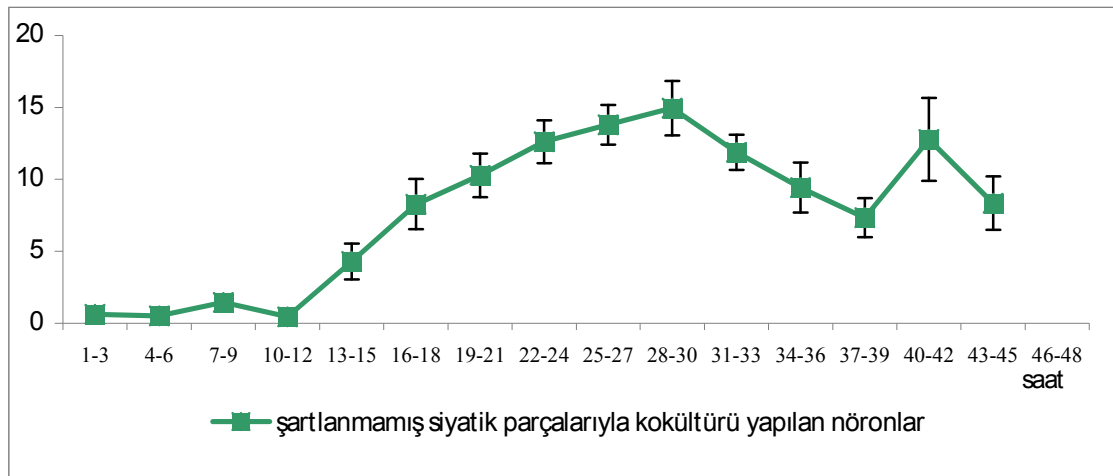
Şekil 4.20. Tüm arka kök ganglionları in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.6. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla yapılan kokültür deneyi

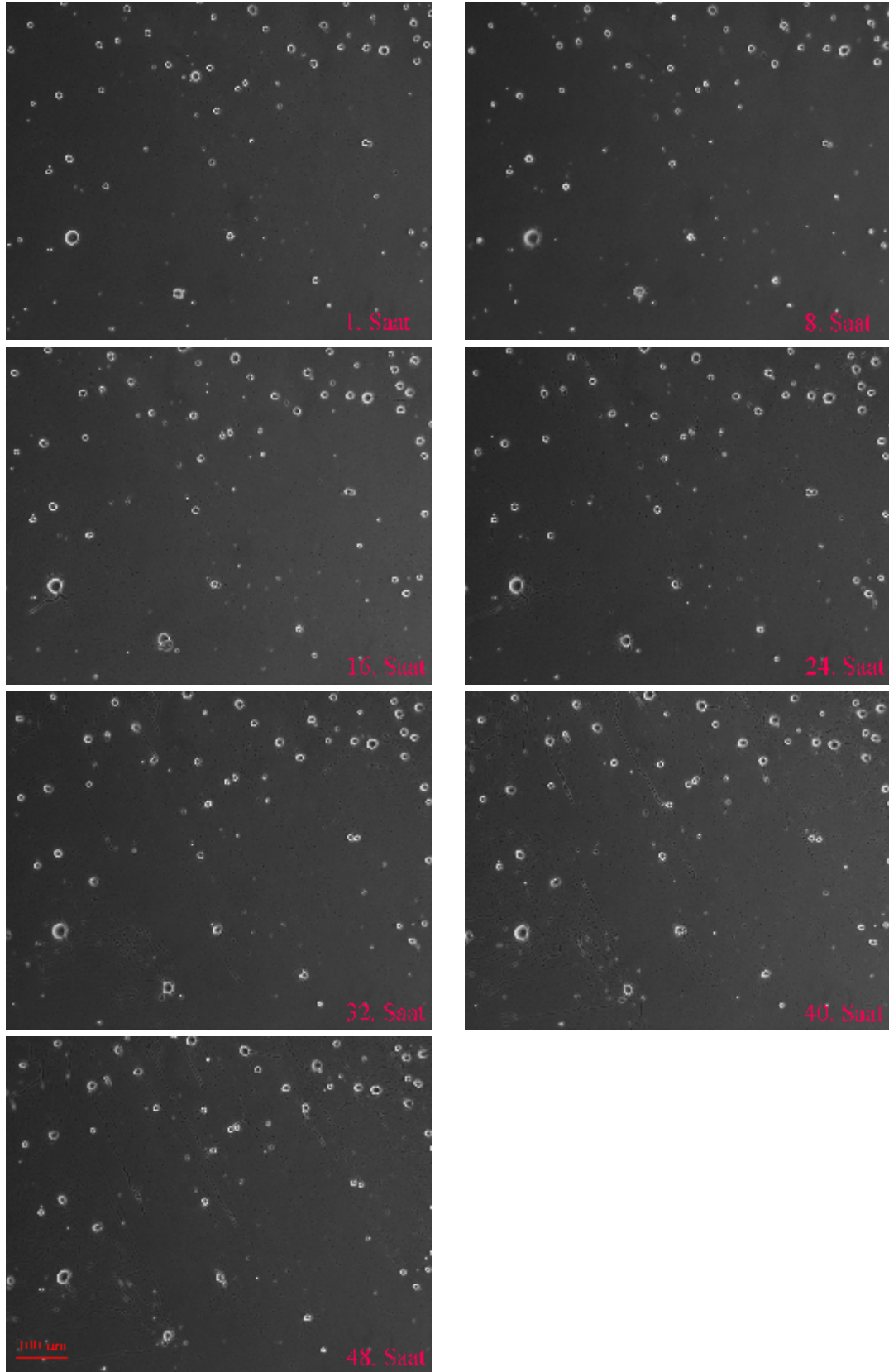
Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte yapılan kokültür nöronlarının rejenerasyon hızının ilk 12 saatte hızla arttıktan sonra 48. saate kadar stabil bir hızla rejenerasyona devam ettikleri gözlemlendi (Şekil 4.21). Bu grubun rejenerasyon aktivitesinin ise ilk 12 saatte en az seviyede olduğu ve değişmediği, daha sonra 30. saate kadar düzenli bir artışın ardından 48. saate doğru önce kademeli daha sonra düzensiz bir azalma eğilimi gösterdiği saptandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



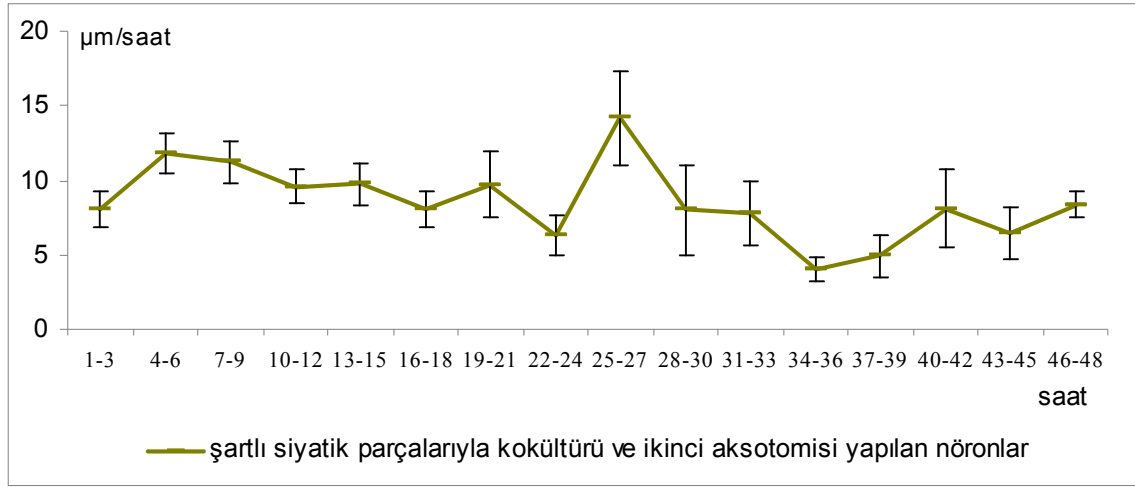
Şekil 4.22. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



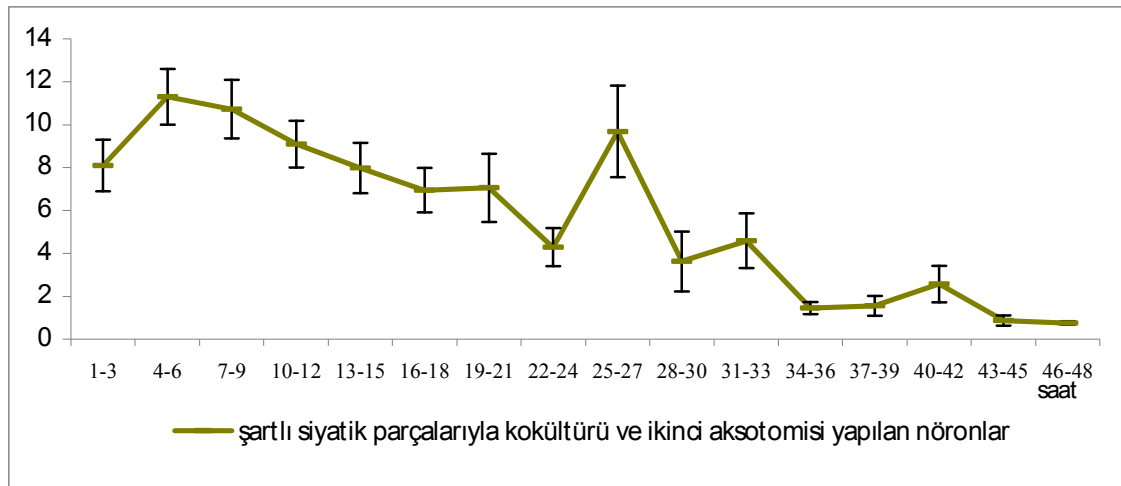
Şekil 4.23. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla birlikte kokültürü yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.7. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların ikinci aksotomi deneyi

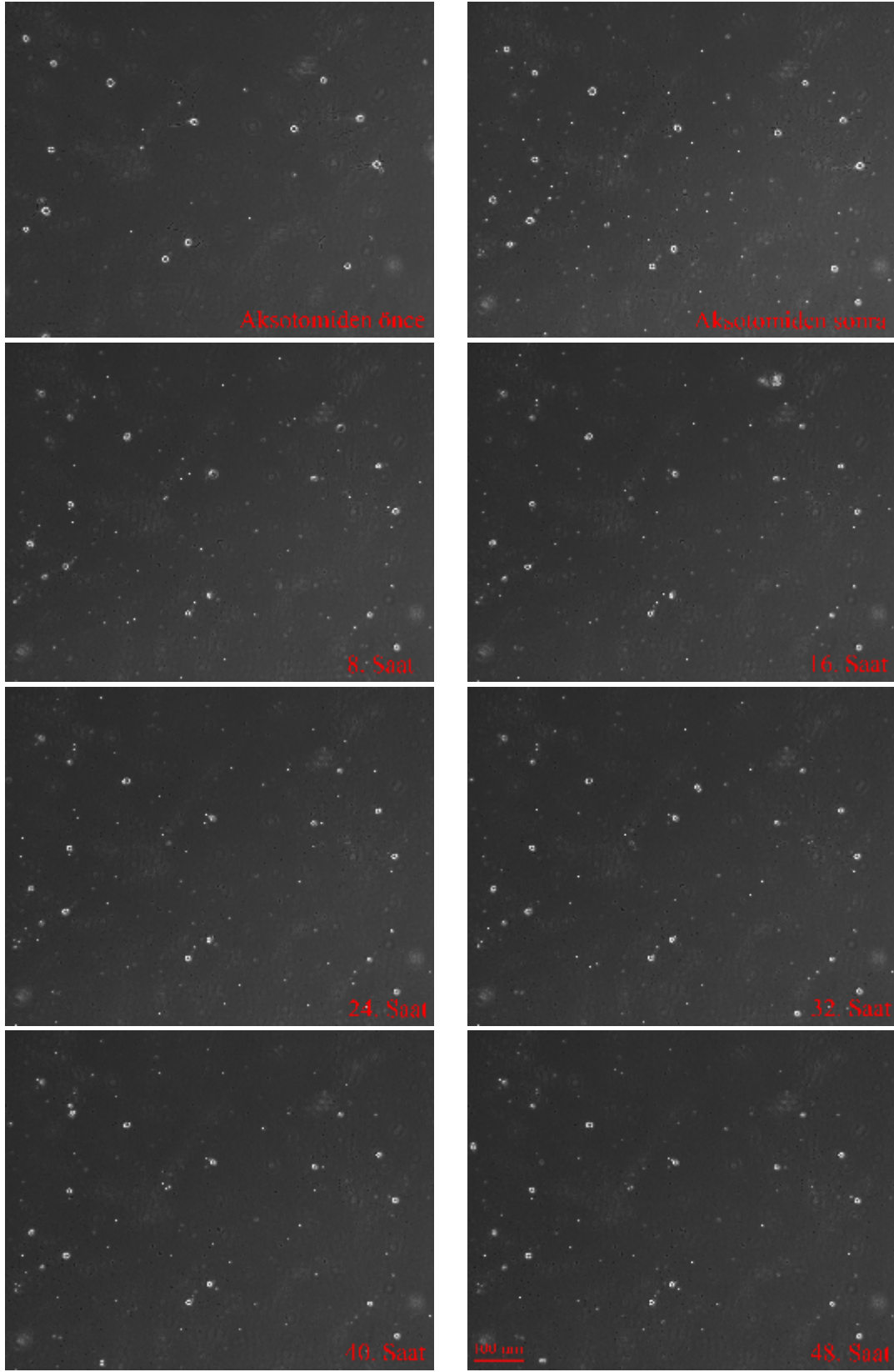
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitelerinin benzer bir tablo çizdiği gözlemlendi. Buna göre; ilk saatlerde az bir artışın ardından 24. saate kadar kademeli bir azalmanın olduğu, ikinci 24 saate artan bir hız ve aktivite ile başladıktan sonra düzensiz bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.24, 4.25).



Şekil 4.24. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



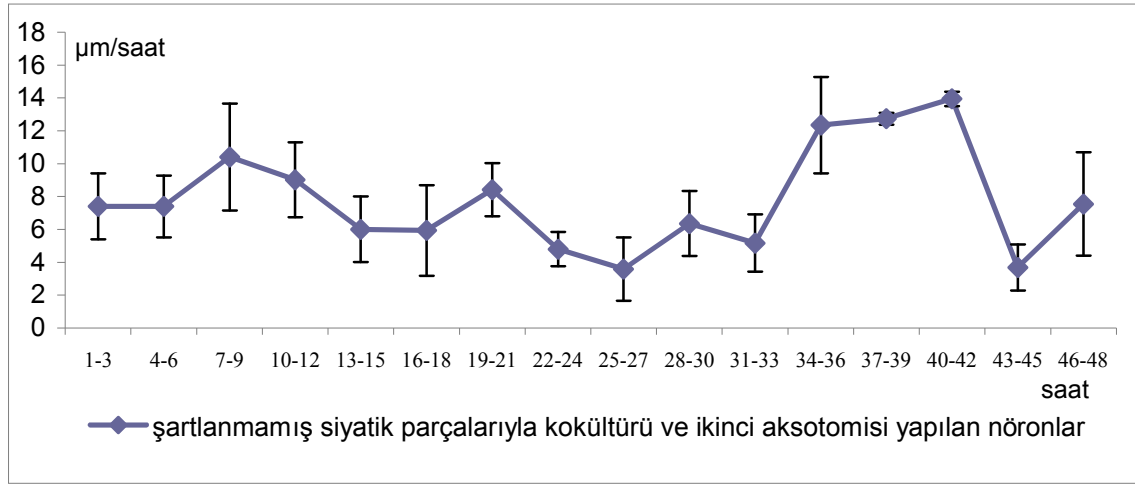
Şekil 4.25. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



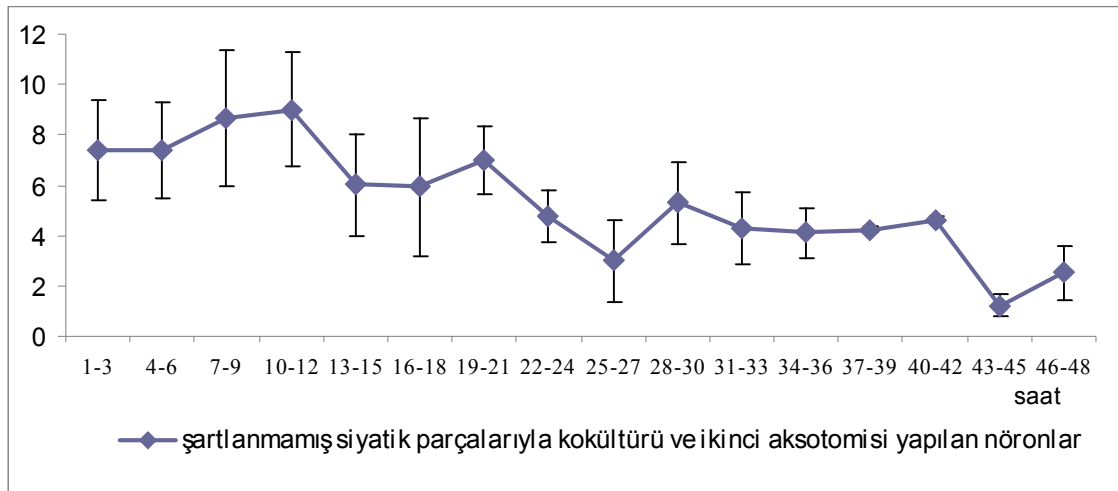
Şekil 4.26. Şartlı siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.8. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların ikinci aksotomi deneyi

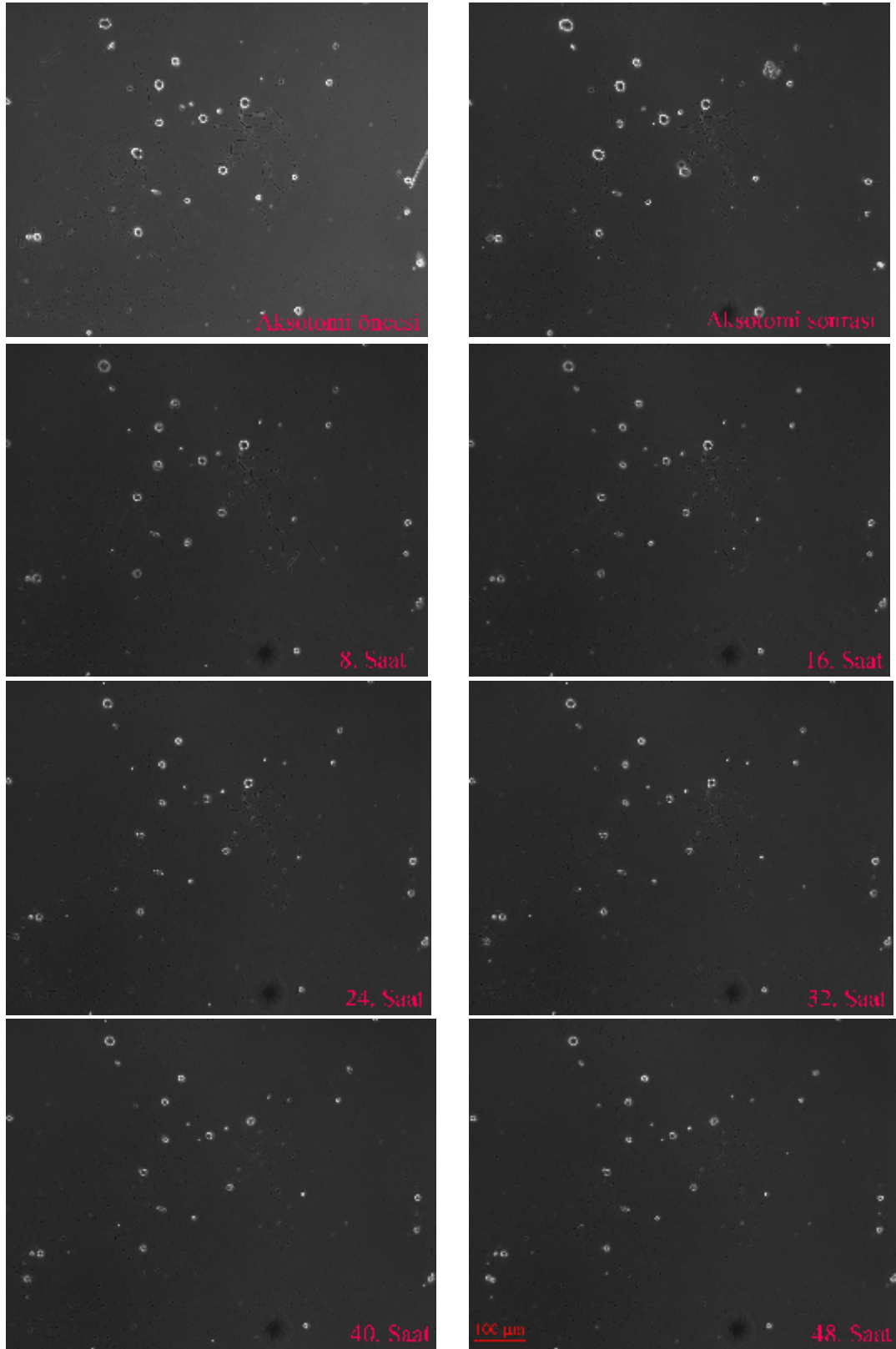
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hızlarının ilk 33 saatte düzensiz bir azalma gösterdiği 42. saate kadar bu hızın bir miktar arttıktan sonra tekrar azalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.27). Bu nöronların rejenerasyon aktivitelerindeki ilk 24 saatte gözlenen azalmanın ikinci 24 saatte de kademeli olarak devam ettiği saptandı (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



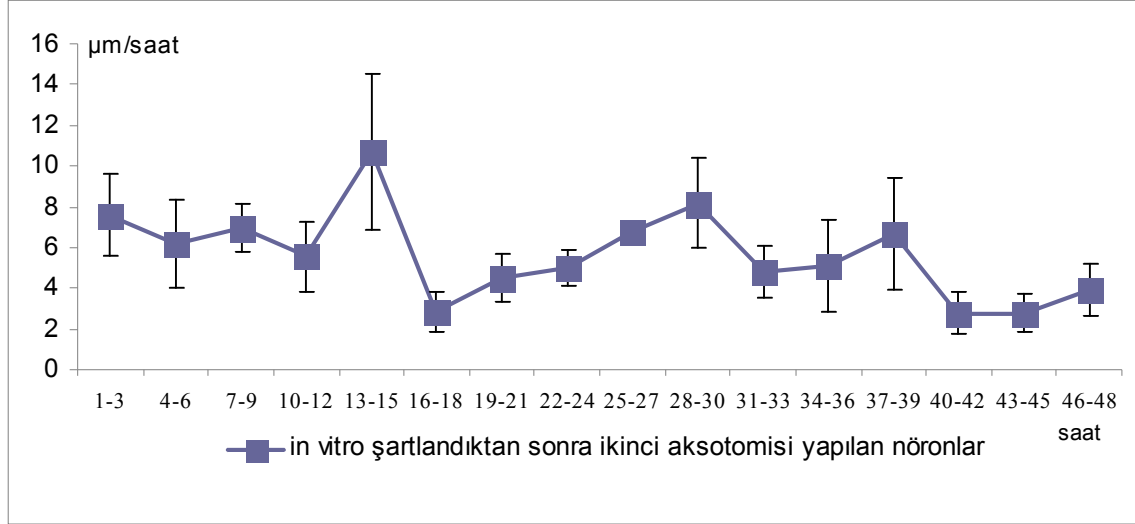
Şekil 4.28. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



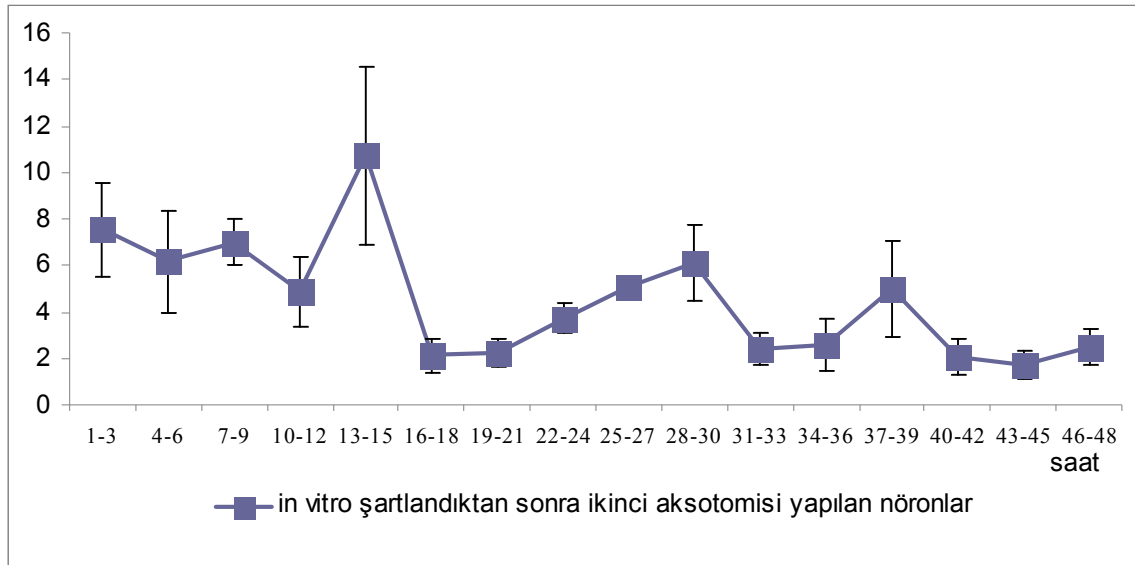
Şekil 4.29. Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.9. İn vitro şartlanan nöronların ikinci aksotomi deneyi

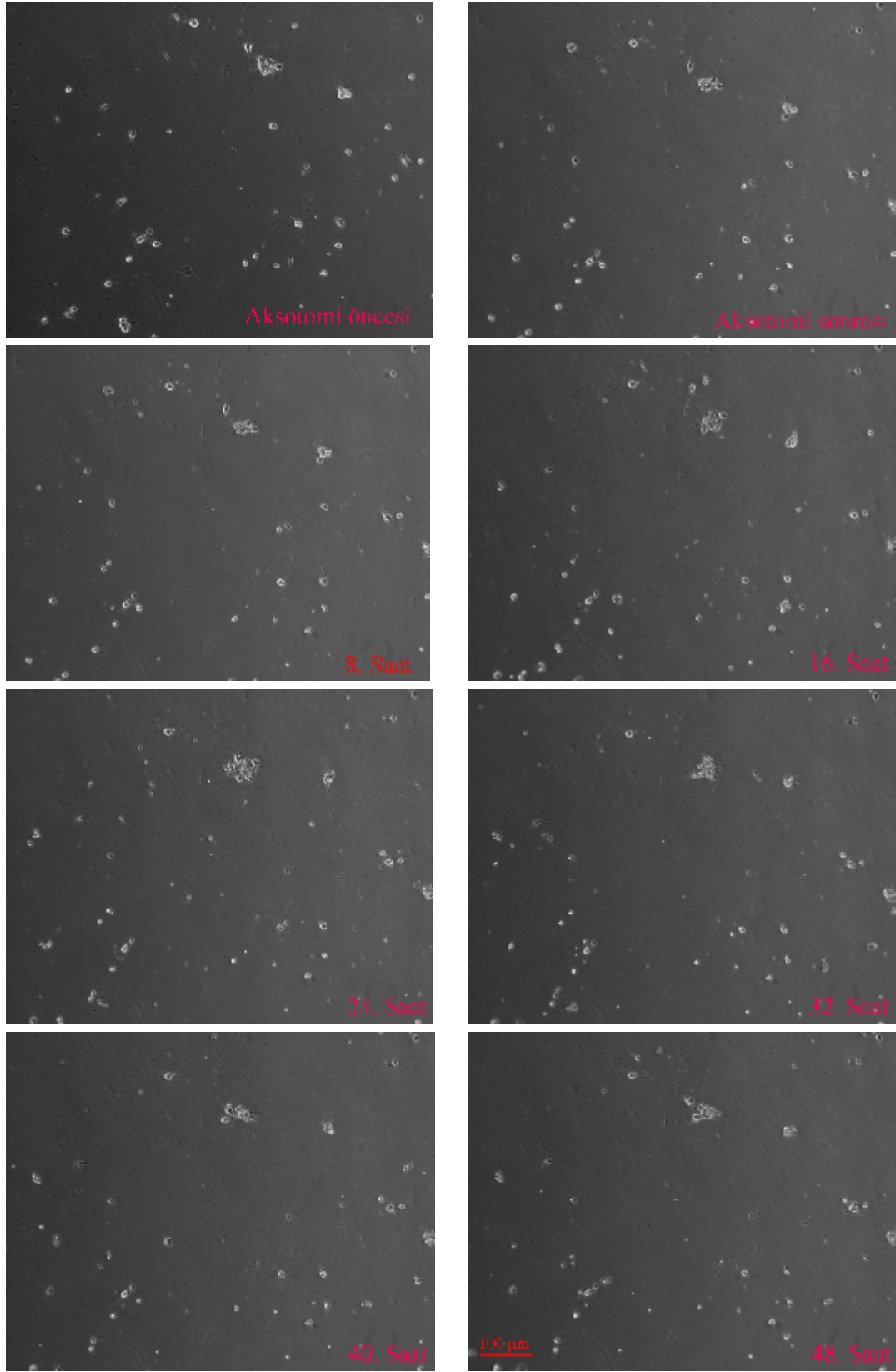
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitesi benzer bir tablo çizdi. İlk 18 saatte hız ve aktivitenin düzensiz bir azalma davranışı sergiledikleri, daha sonra 30. saate kadar kademeli olarak arttıktan sonra tekrar düzensiz bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.30, 4.31).



Şekil 4.30. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



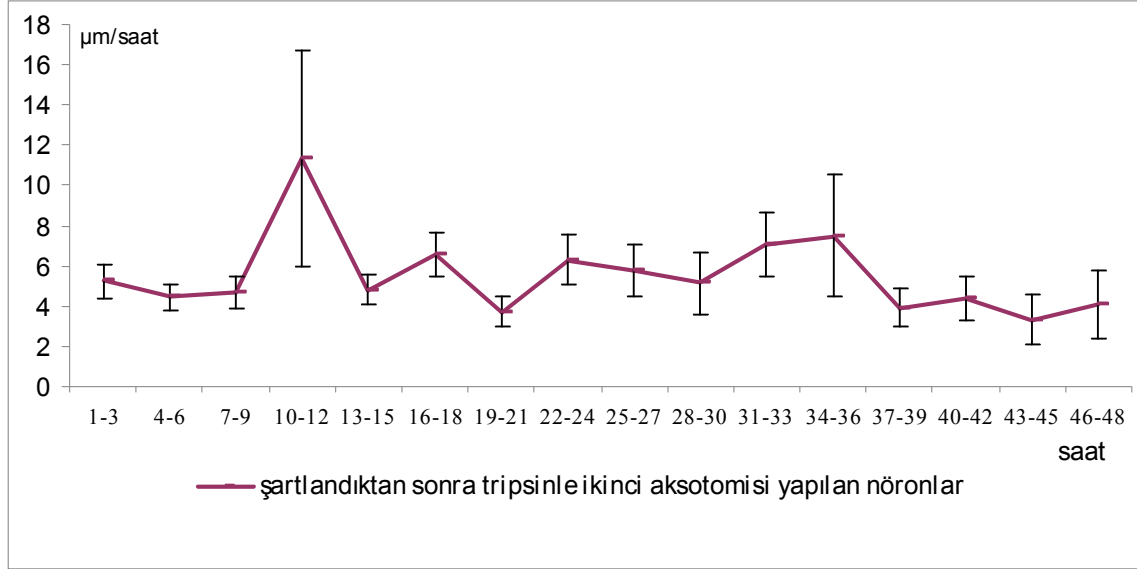
Şekil 4.31. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



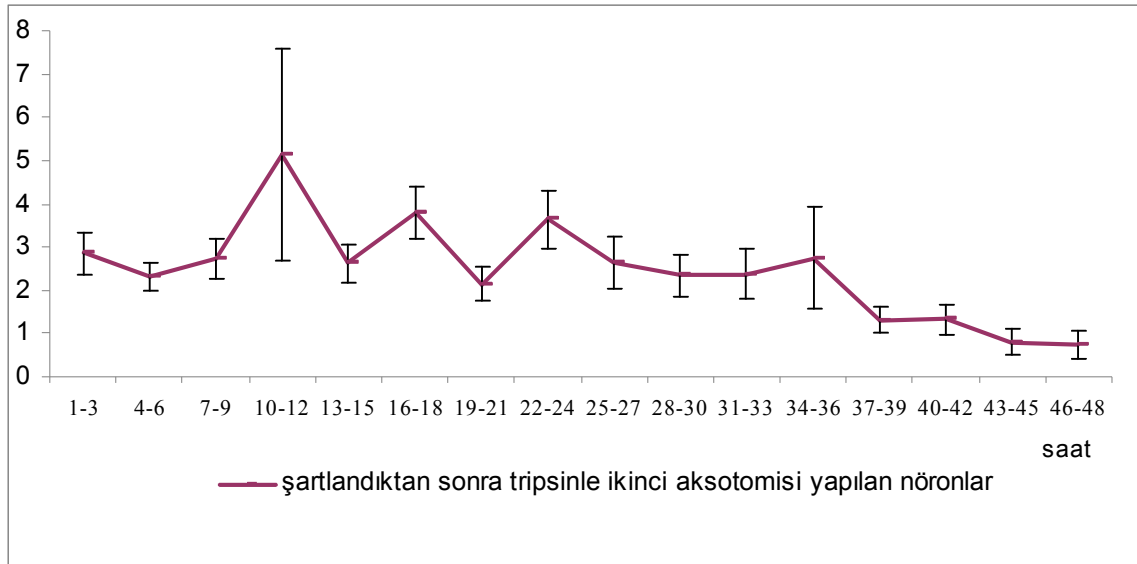
Şekil 4.32. İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.10. Şartlanan hücrelerin tripsinle ikinci aksotomi deneyi

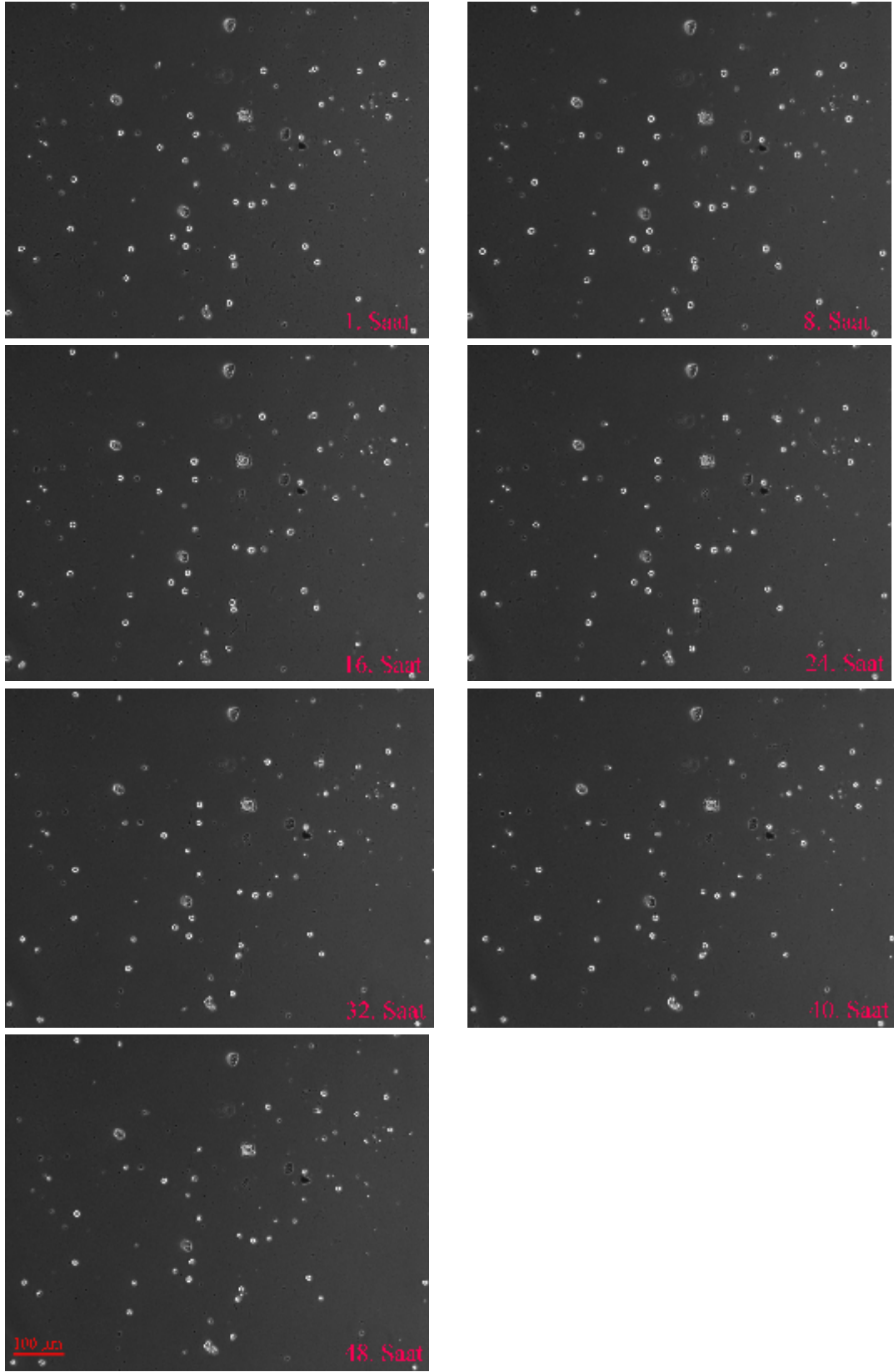
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitelerinin benzer oldukları gözlemlendi. Rejenerasyon hız ve aktivitesinin ilk 12 saat arttığı daha sonra stabil ancak azalma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.33., 4.34).



Şekil 4.33. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



Şekil 4.34. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.

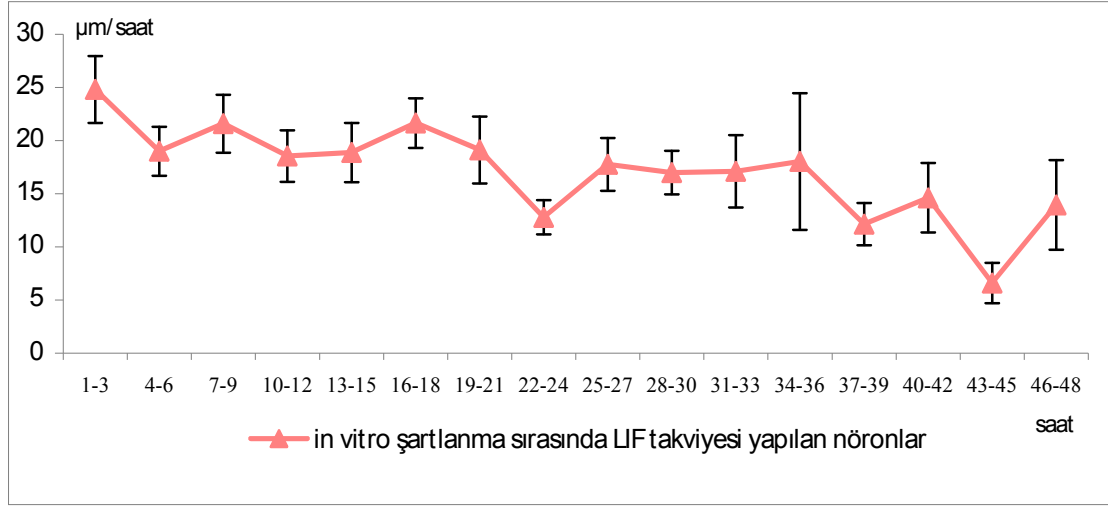


Şekil 4.35. Şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri tripsinle yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

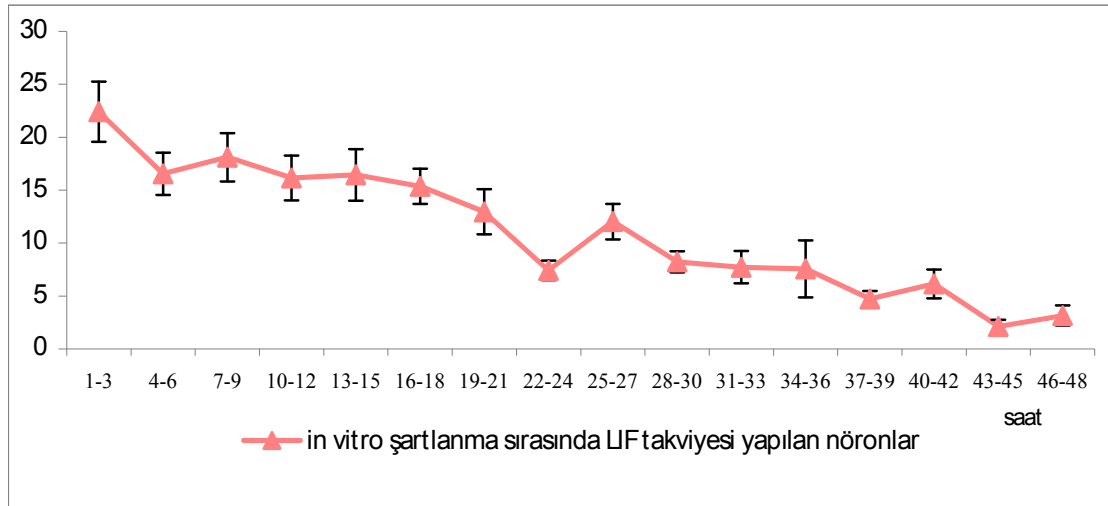
4.1.11. LIF'in şartlandırma etkisindeki rolünün araştırılması

4.1.11.1. Kontrol deneyi

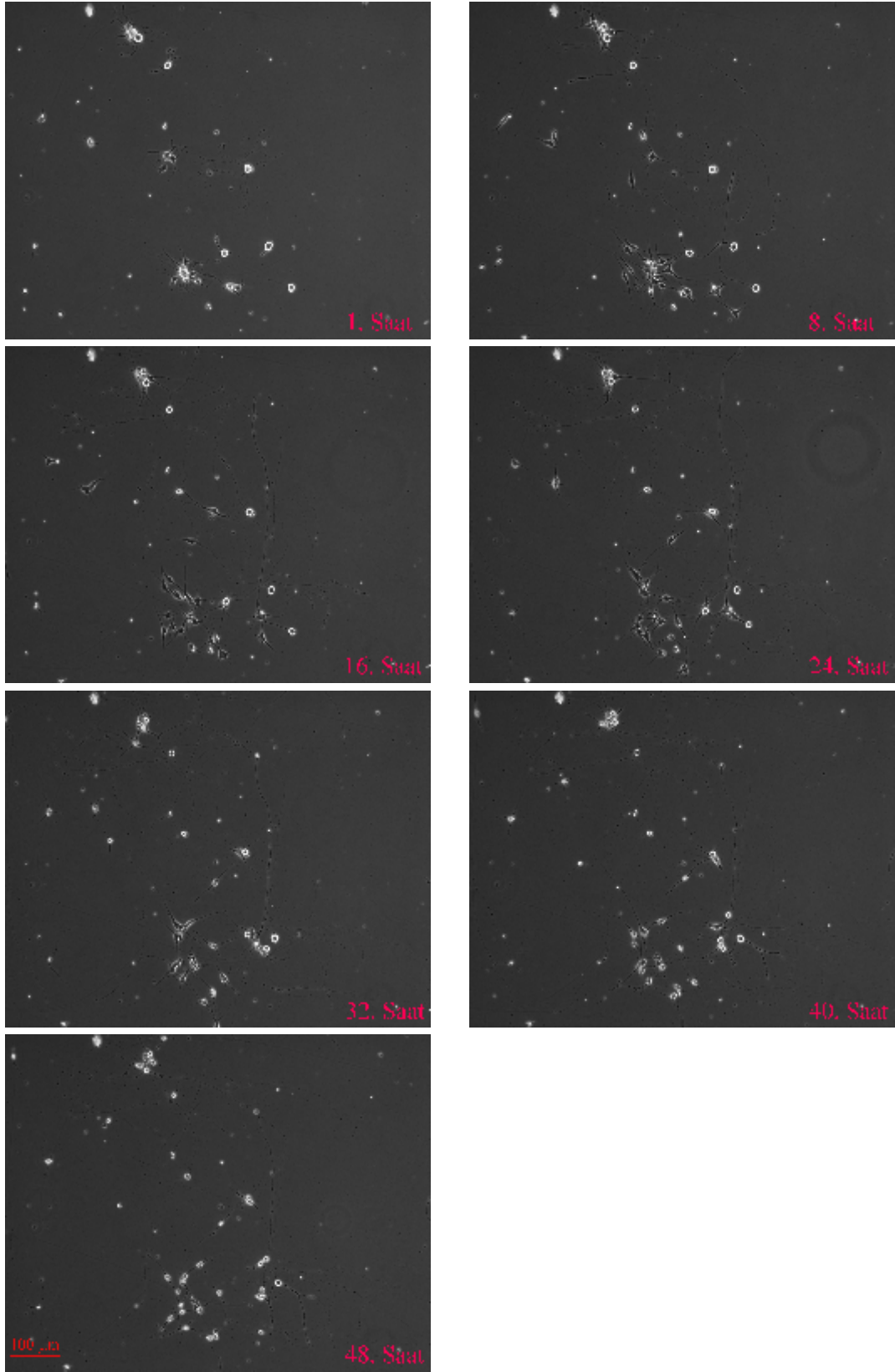
Bu gruptaki nöronların rejenerasyona hızlı başladığı ancak daha sonra bu hızın düzensiz bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.36). Bu nöronların rejenerasyon aktivitesinin de rejenerasyon hızı gibi yüksek seviyede başladıktan sonra 48. saate doğru kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.37)



Şekil 4.36. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



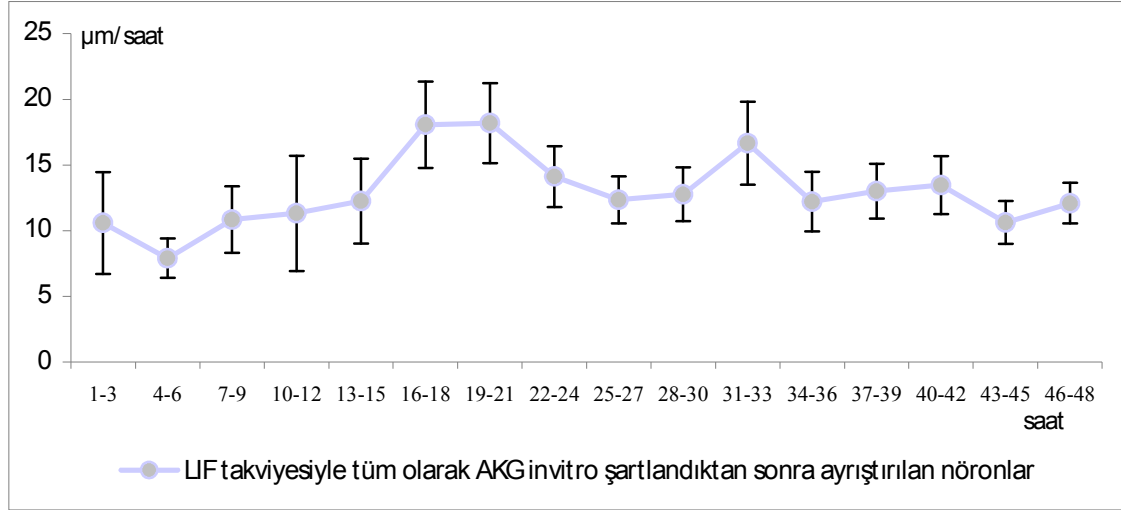
Şekil 4.37. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



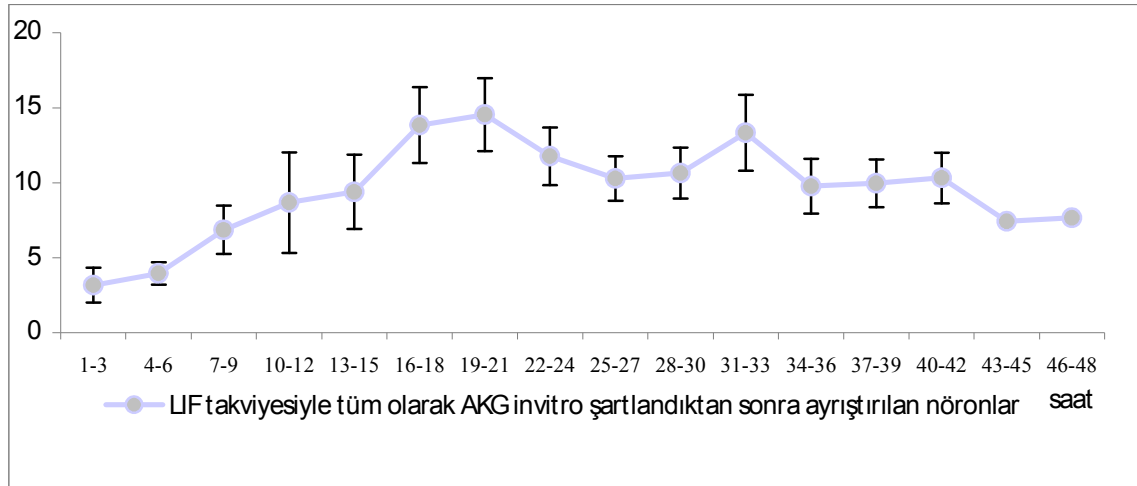
Şekil 4.38. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.11.2. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyi

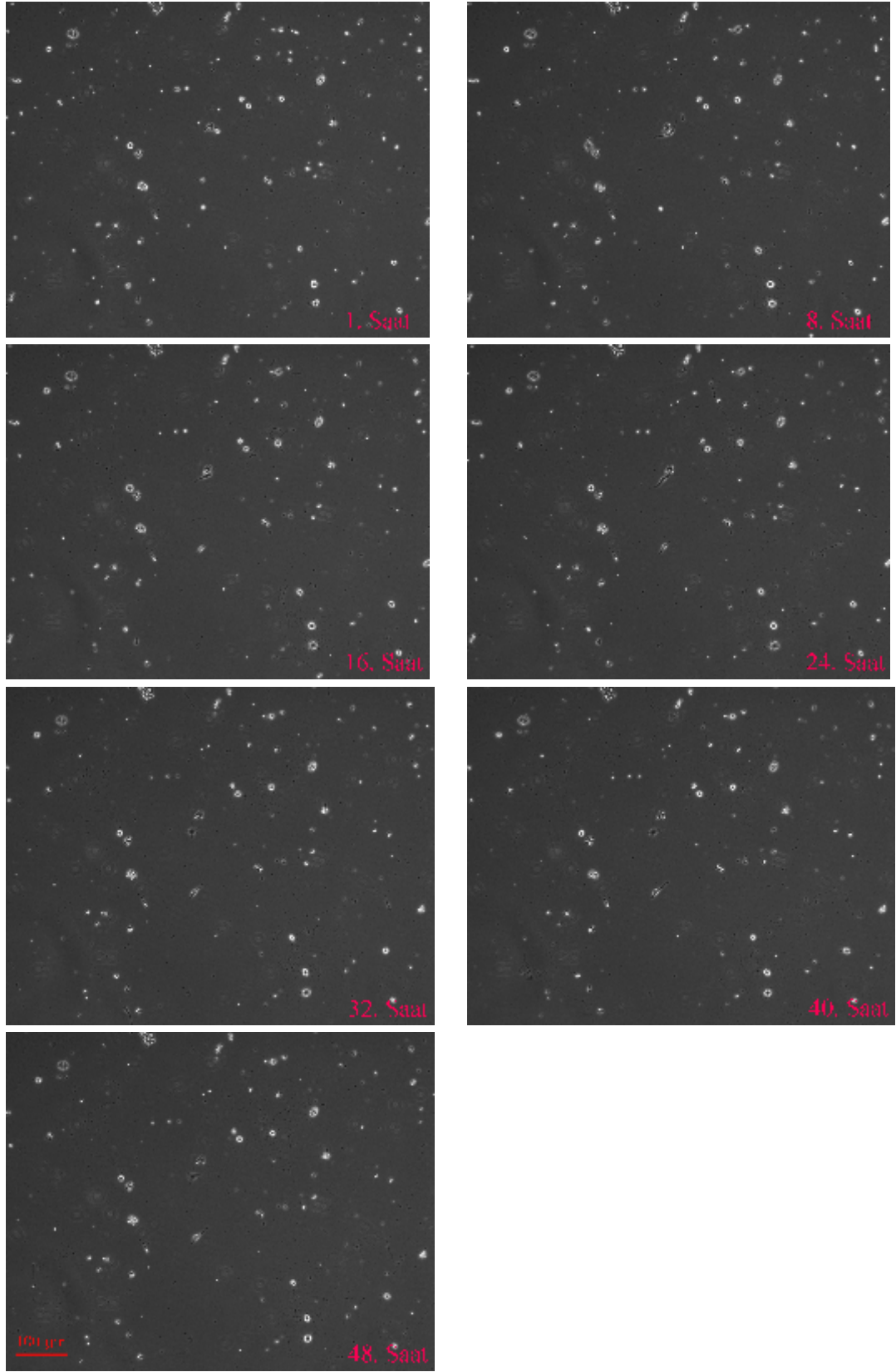
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitesinin birbirine benzer bir tablo çizdikleri gözlemlendi. İlk 21 saatte hızın aktiviteye göre biraz daha düzensiz bir artış gösterdiği, daha sonra 48. saate doğru rejenerasyon hız ve aktivitesinin düzensiz bir azalma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.39, 4.40).



Şekil 4.39 Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon hızı grafiği.



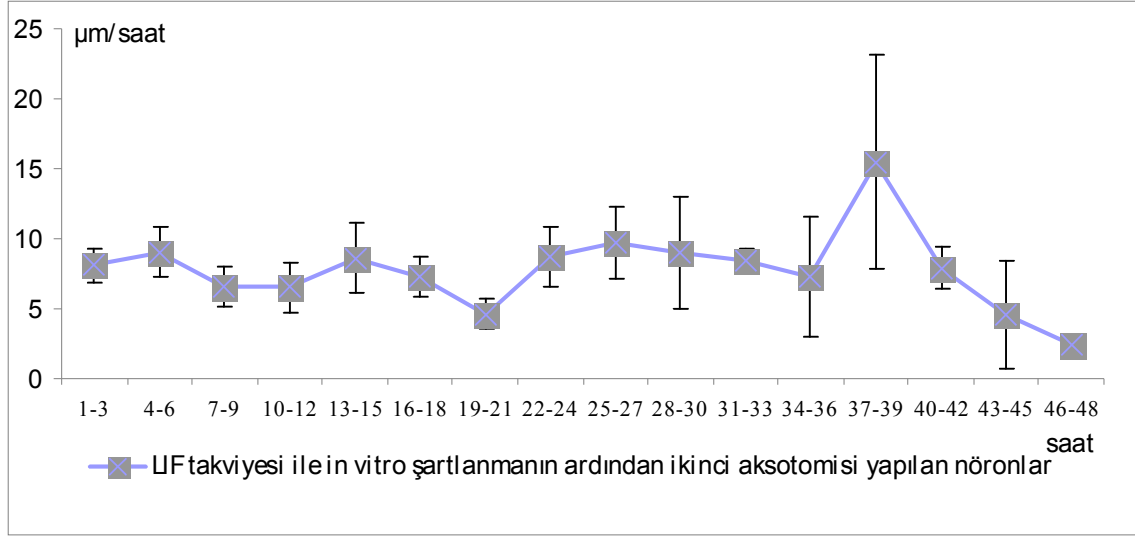
Şekil 4.40. Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.



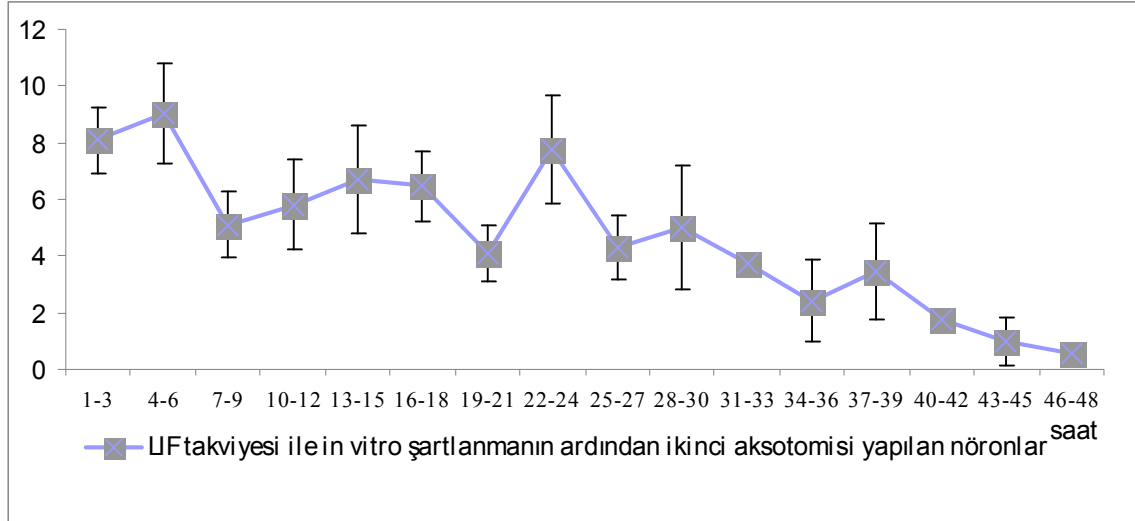
Şekil 4.41. Tüm arka kök ganglionlarının LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.11.3. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyi

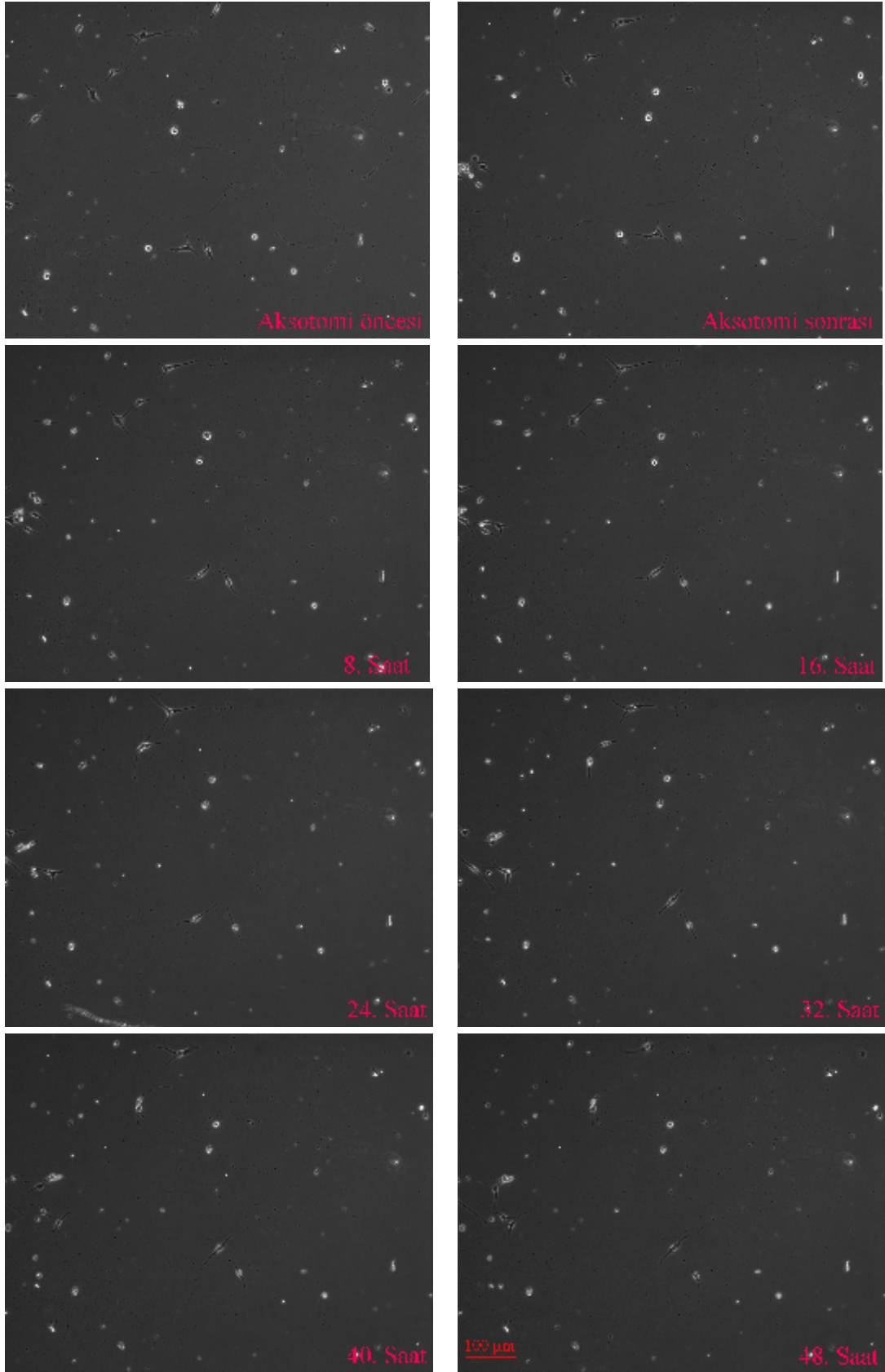
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hızlarının 39. saate kadar stabil olduğu, 39. saatte ani bir artışın ardından hızın kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.42). Bu nöronların rejenerasyon aktivitesinin ise yüksek seviyede başladıktan sonra düzensiz olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4.42. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



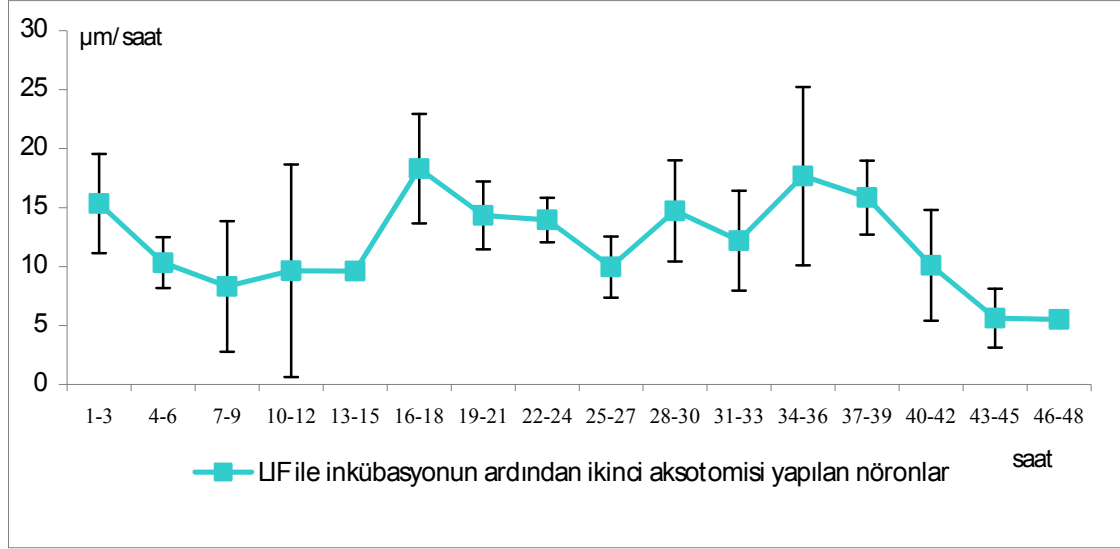
Şekil 4.43. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



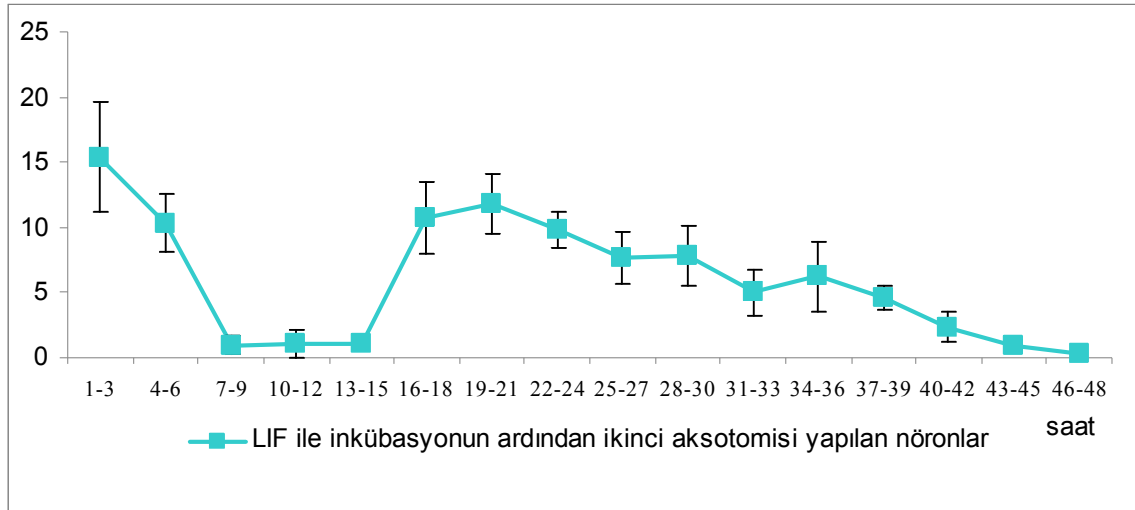
Şekil 4.44. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapıldıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.11.4. Şartlanmamış hücre kültürü ve aksotomi deneyi

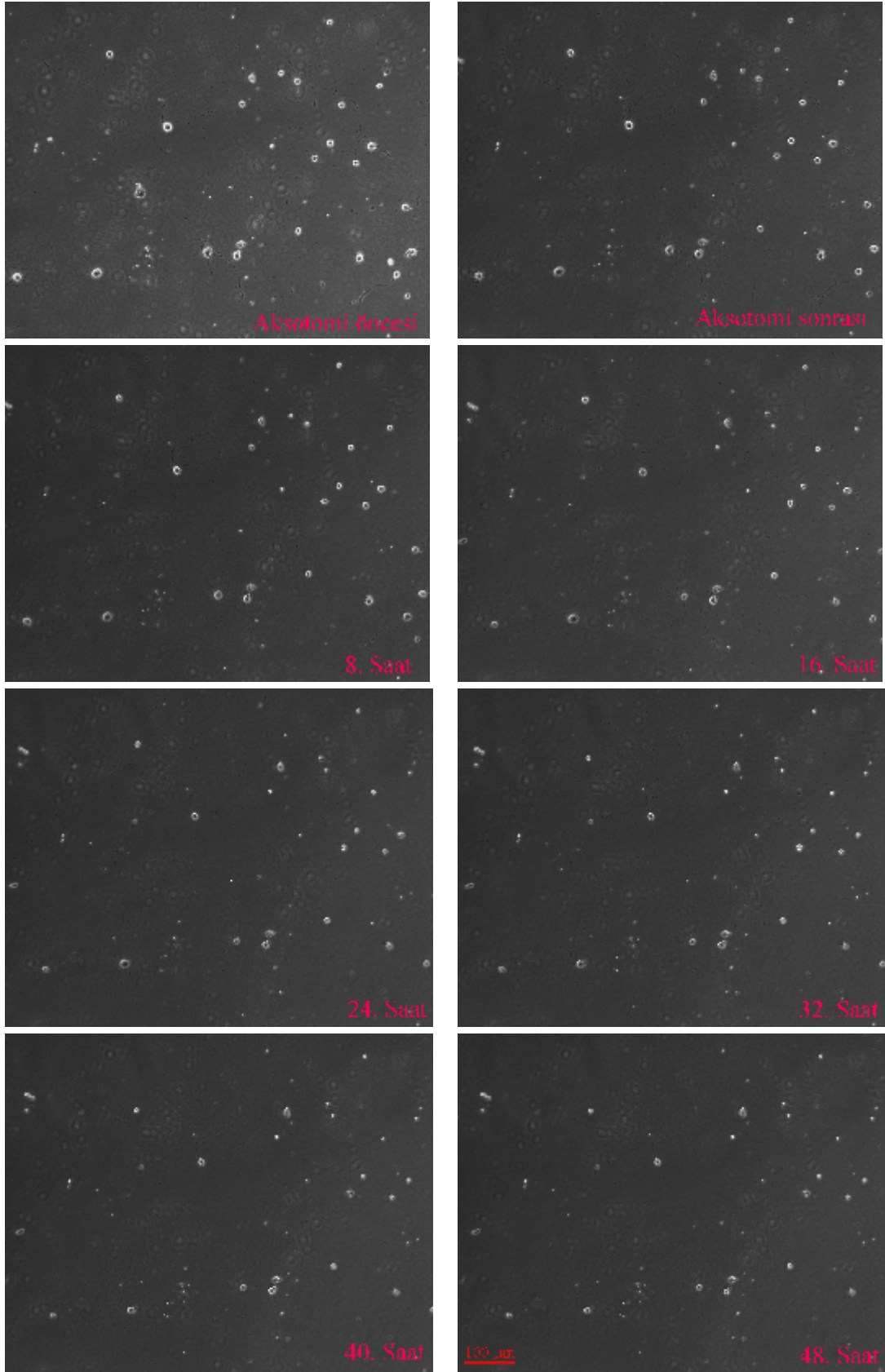
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hızının ilk saatlerde düzensiz bir tablo çizdiği, 18. saatte ani bir artışın ardından yine düzensiz bir hız sergilediği ve 48. saate doğru hızın kademeli olarak azalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.45). Bu nöronların rejenerasyon aktivitesinin ise; ilk 15 saatte ani bir şekilde azaldıktan sonra 21. saate kadar arttığı ve daha sonra aktivitenin kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.46).



Şekil 4.45. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



Şekil 4.46. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.

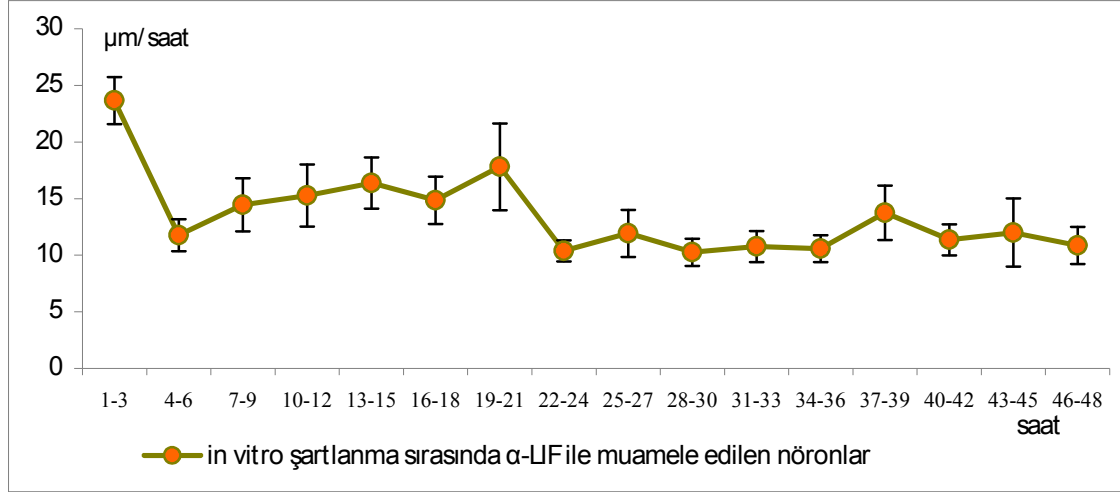


Şekil 4.47. LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

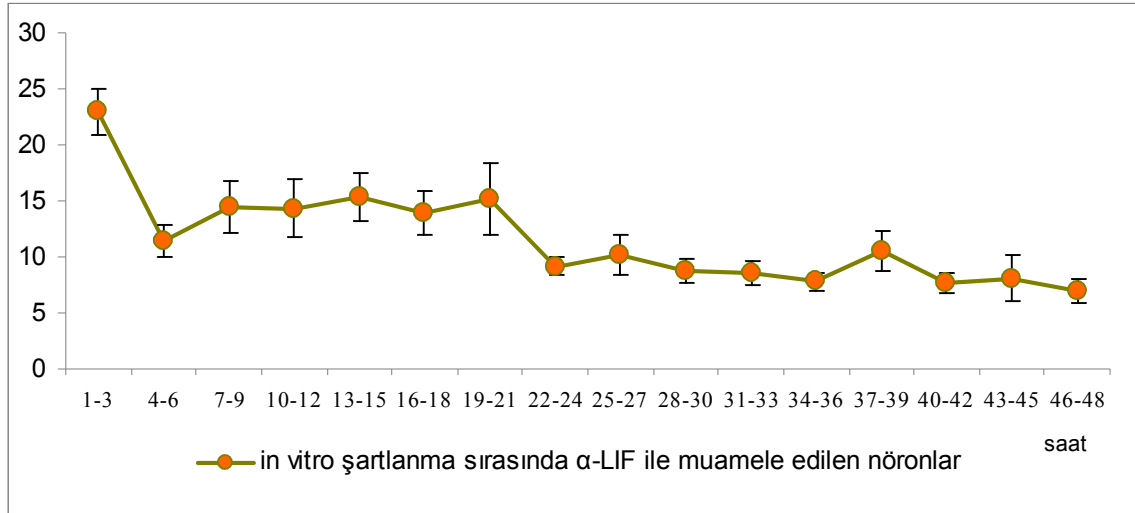
4.1.12. LIF inhibisyon deneyleri

4.1.12.1 Kontrol deneyi

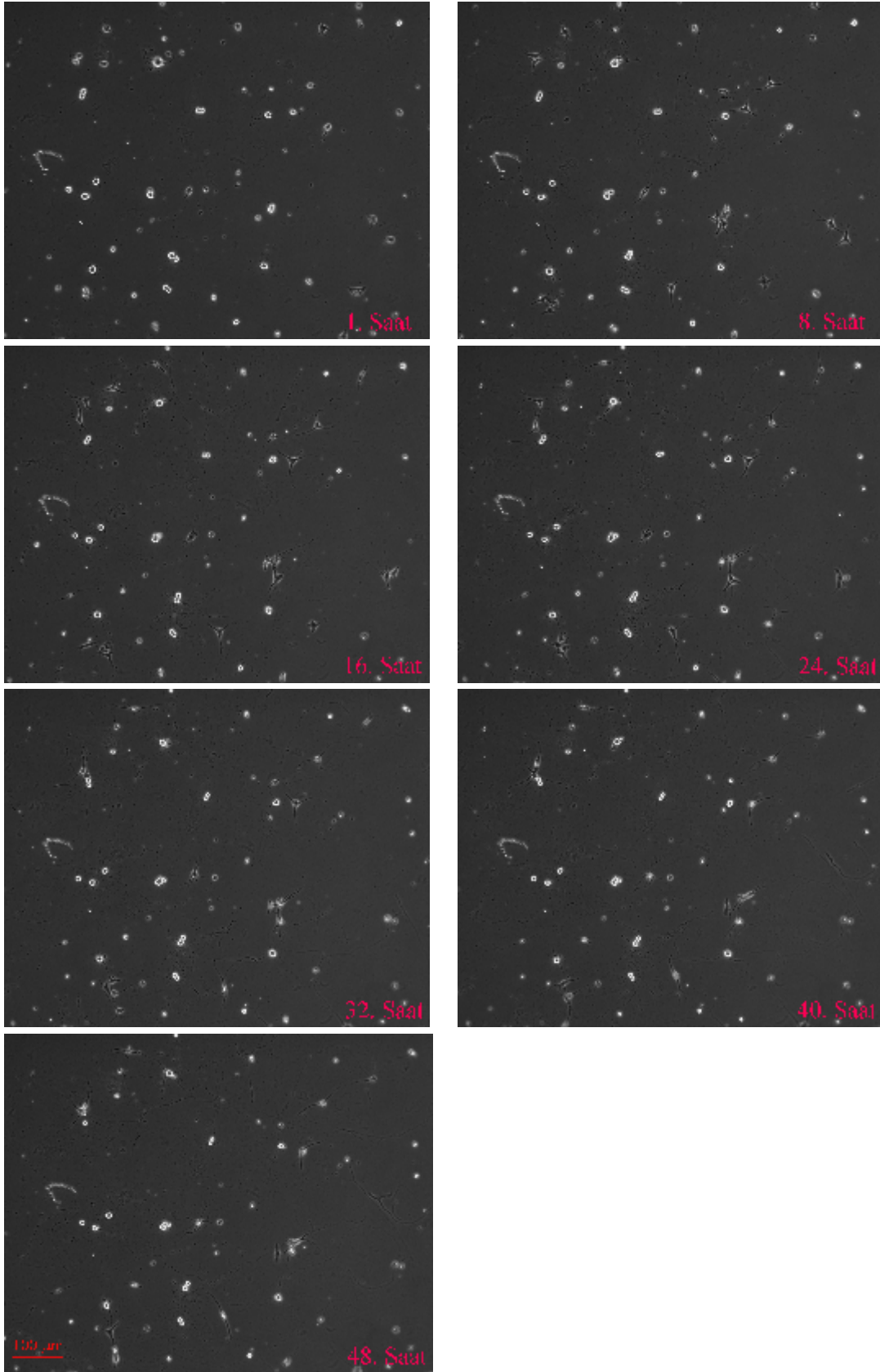
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitesinin benzer bir tablo çizerek; başlangıçta yüksek seviyede olan hız ve aktivitenin stabil, ancak azalma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4. 48, 4.49).



Şekil 4.48. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



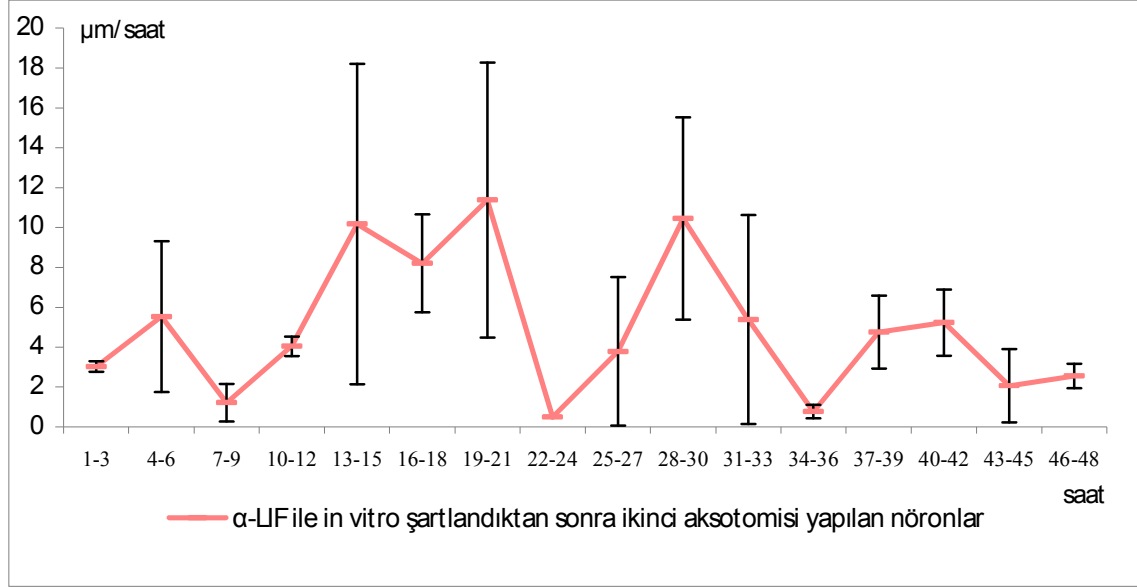
Şekil 4.49. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



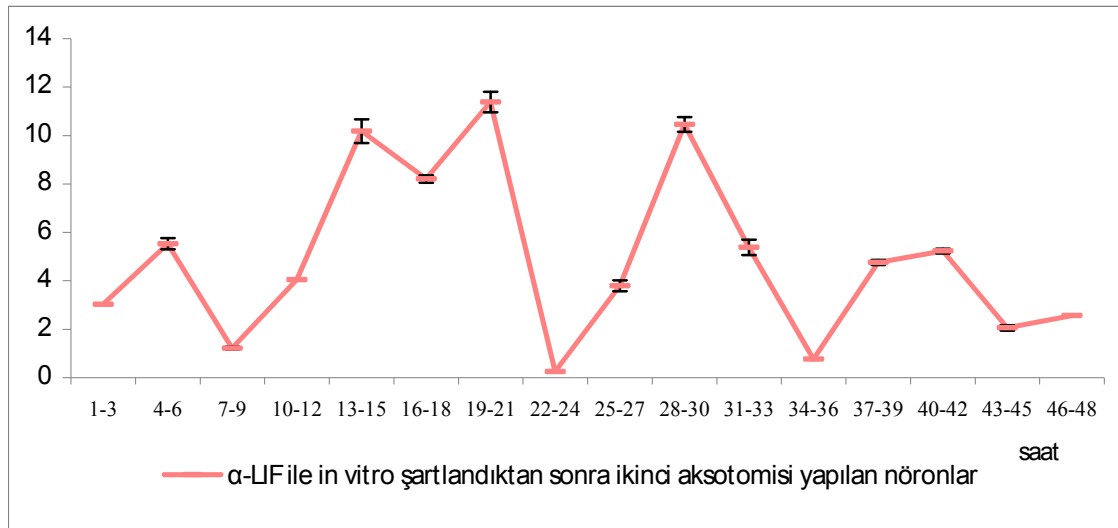
Şekil 4.50 İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.12.2. İn vitro şartlı hücreler ve aksotomi deneyi

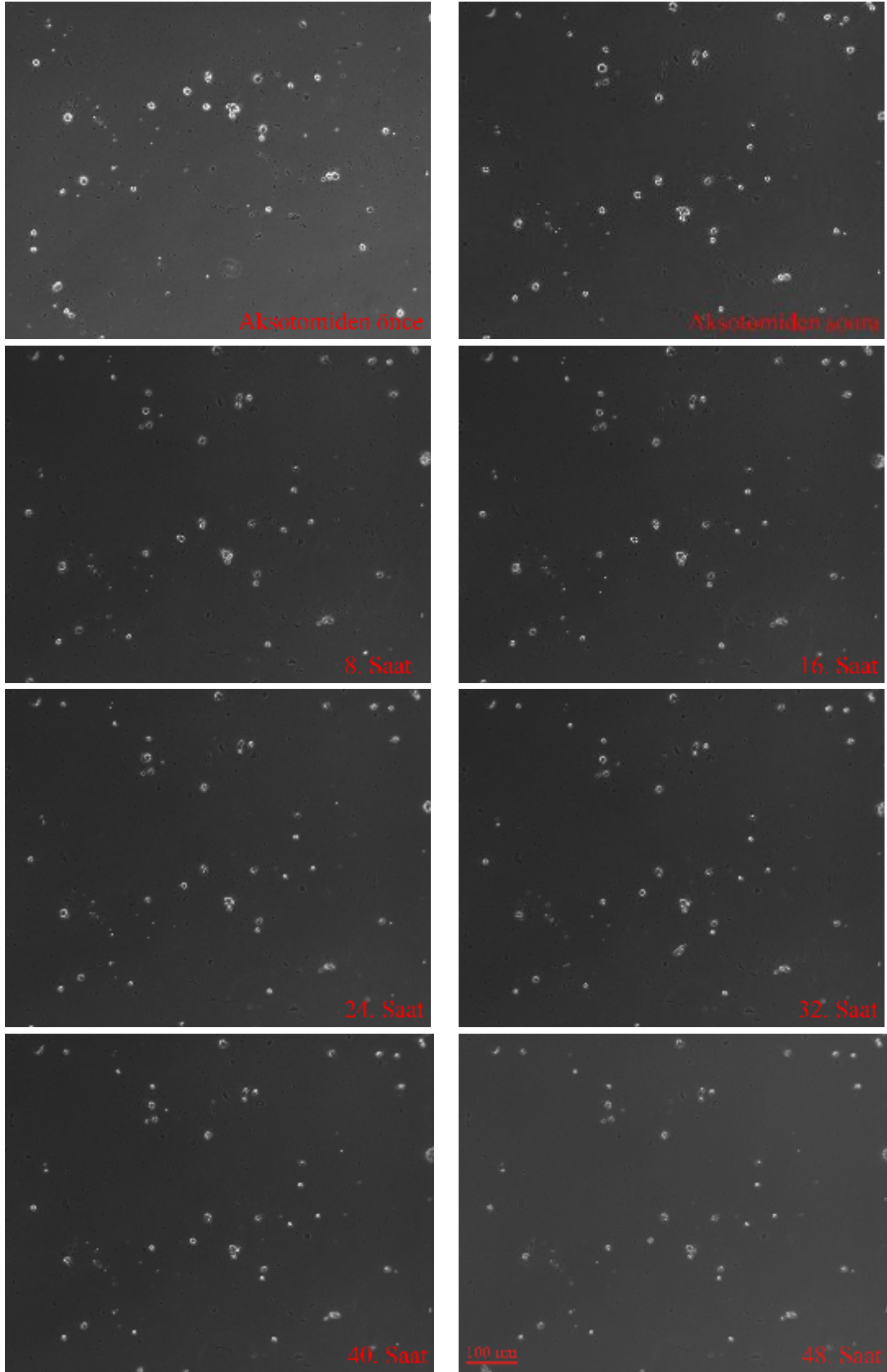
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hız ve aktivitesinin benzer olduğu ve oldukça düzensiz bir tablo çizerek 48. saatte doğru azalma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.51, 4.52).



Şekil 4.51. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



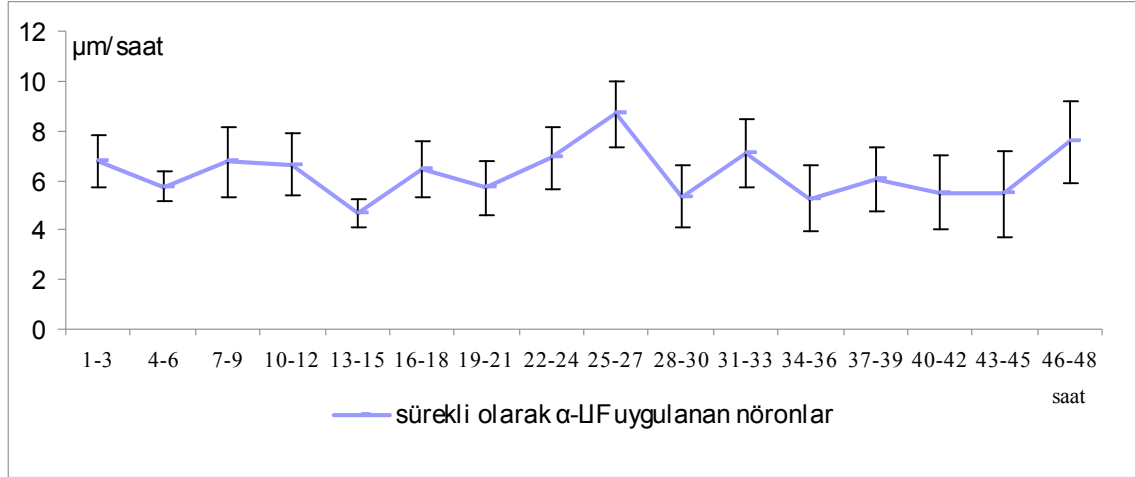
Şekil 4.52 Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.



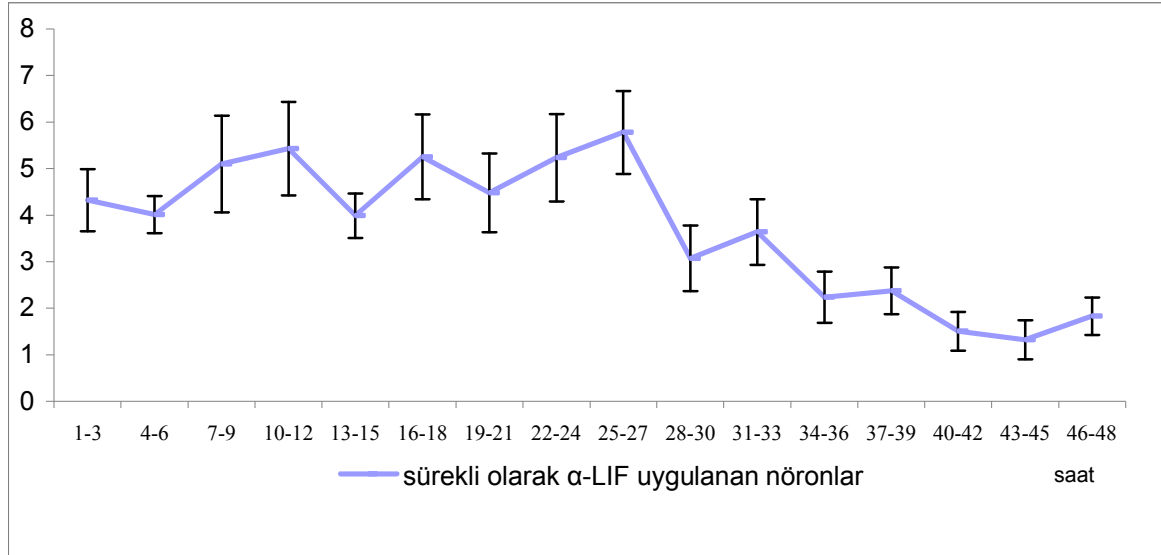
Şekil 4.53. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.12.3. İn vitro şartlı hücrelere sürekli α -LIF uygulaması deneyi

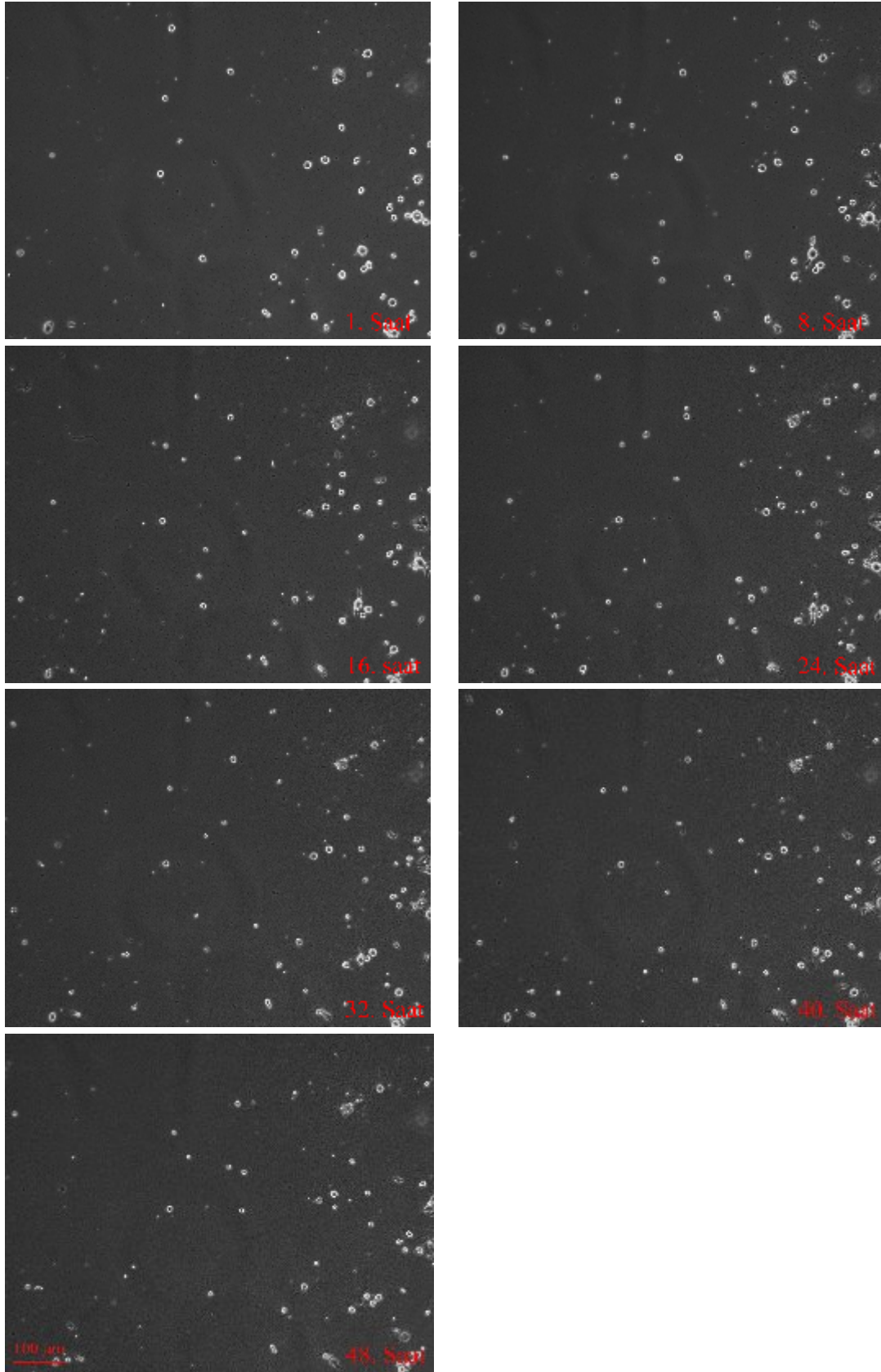
Bu gruptaki nöronların rejenerasyon hızının 48 saat boyunca stabil olduğu (Şekil 4.54), aktivitesinin ise 48 saat boyunca stabil ancak azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.55).



Şekil 4.54. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon hızı grafiği.



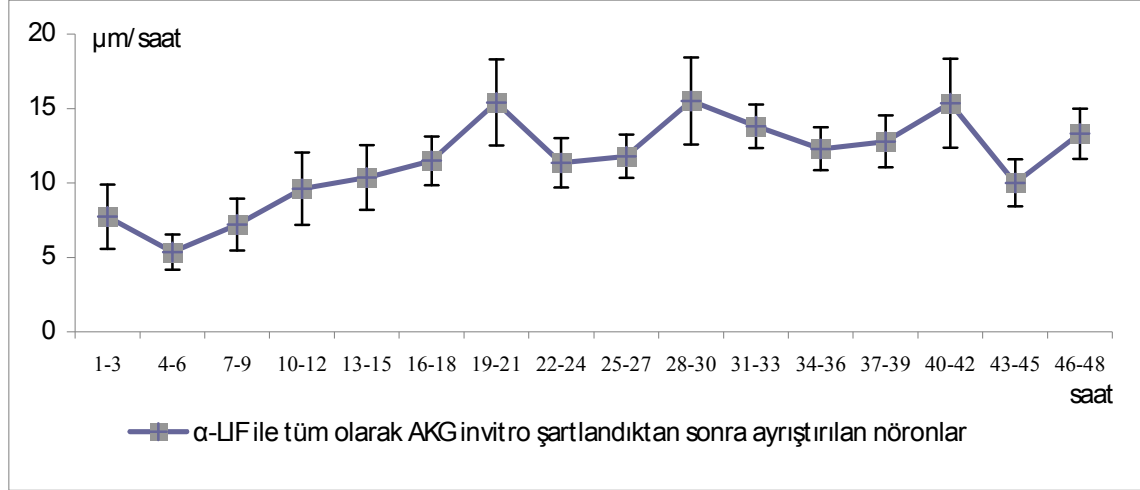
Şekil 4.55. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon aktivitesi grafiği.



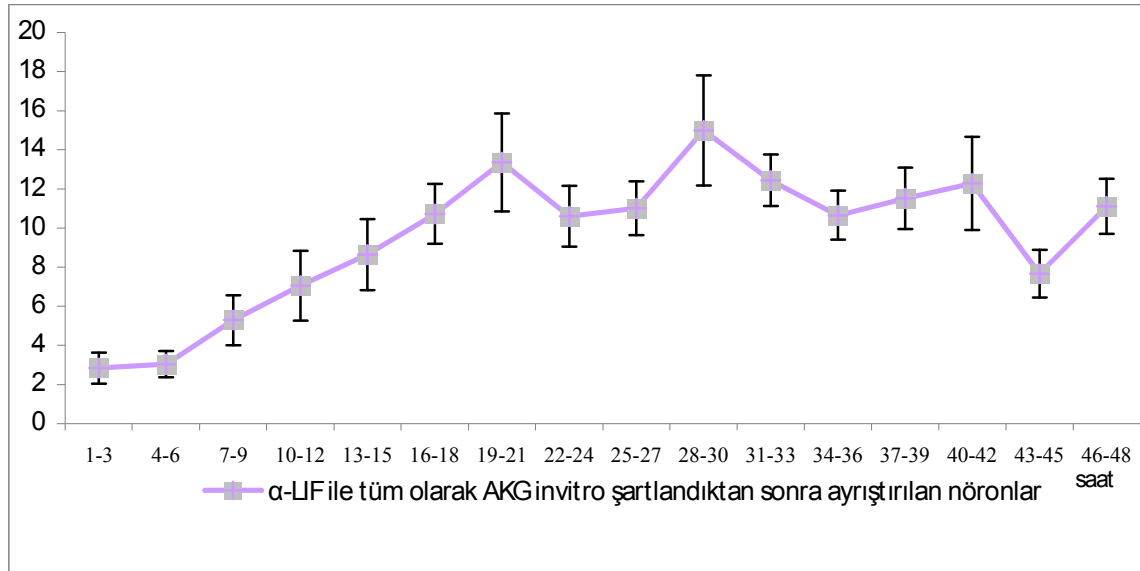
Şekil 4.56. Sürekli olarak anti-LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

4.1.12.4. Tüm arka kök ganglionlarını şartlandırma deneyi

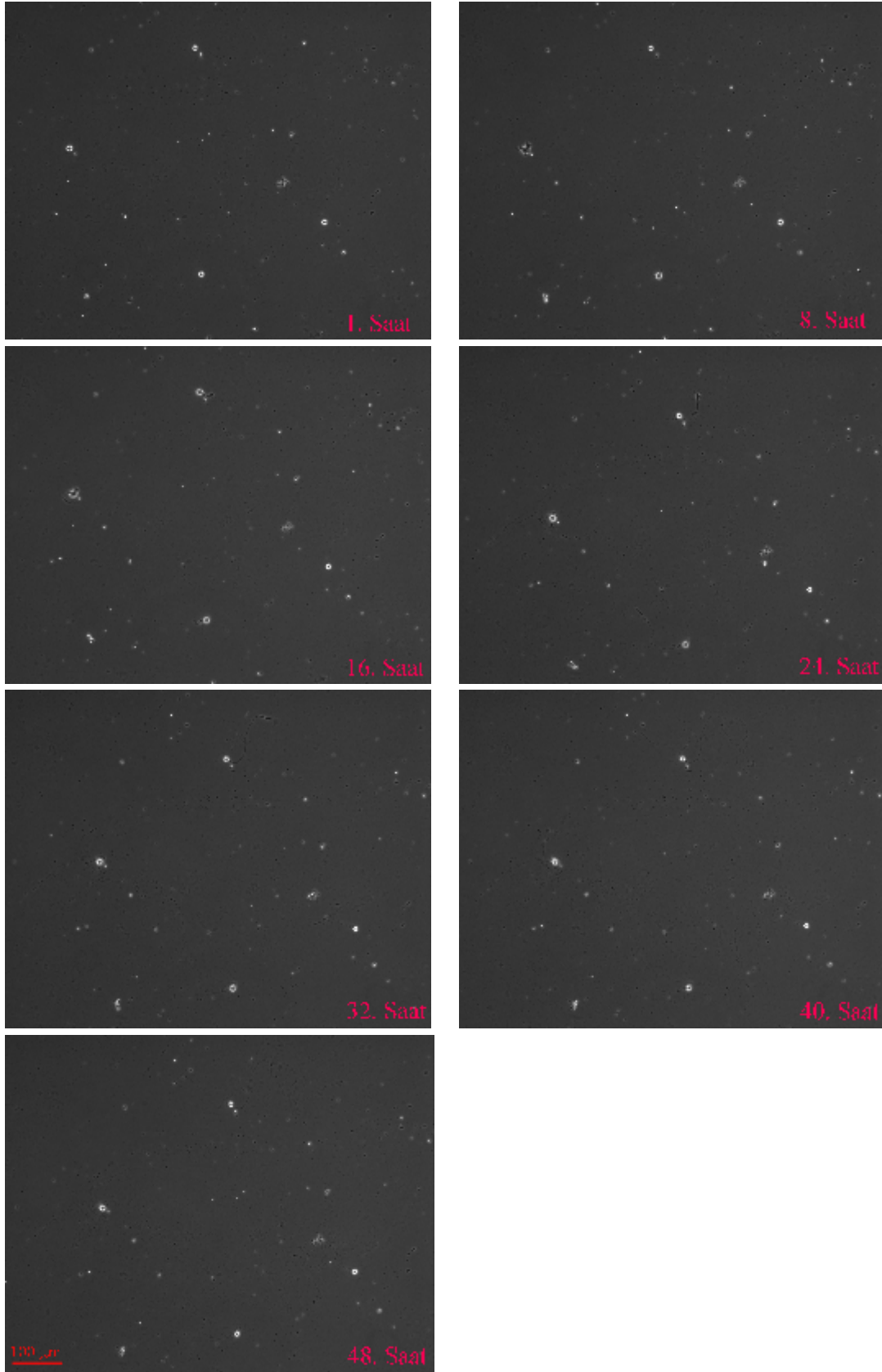
Bu gruptaki nöronların ilk 21 saat rejenerasyon hız ve aktivitesinin kademeli olarak arttıktan sonra ikinci 24 saatte düzensiz bir hız ve aktivite davranışı gösterdikleri saptandı (Şekil 4.57, 4.58)



Şekil 4.57 Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.



Şekil 4.58. Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının rejenerasyon aktivitesi grafiği.

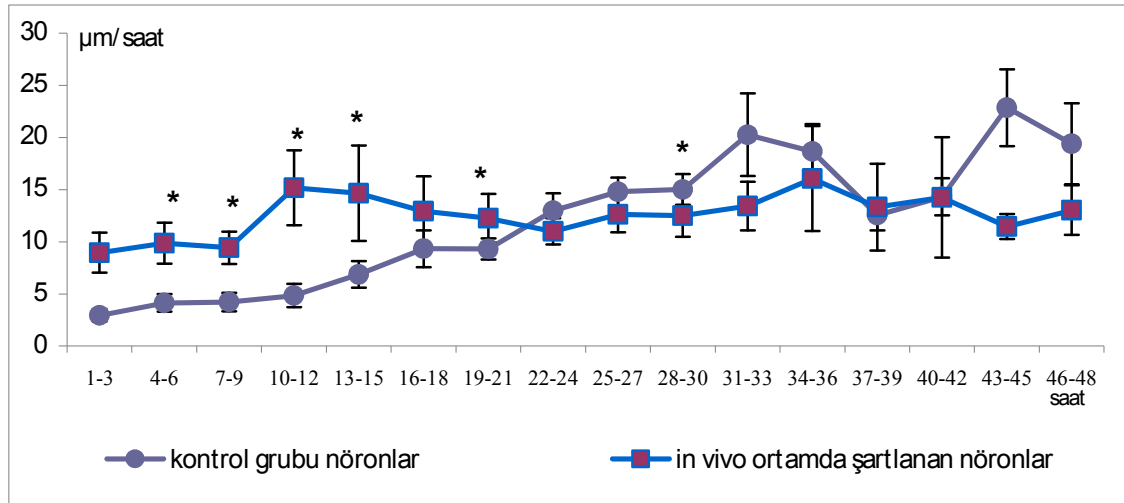


Şekil 4.59. Tüm arka kök ganglionlarının anti-LIF ile in vitro ortamda şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarının her 8 saatte bir alınan görüntüleri.

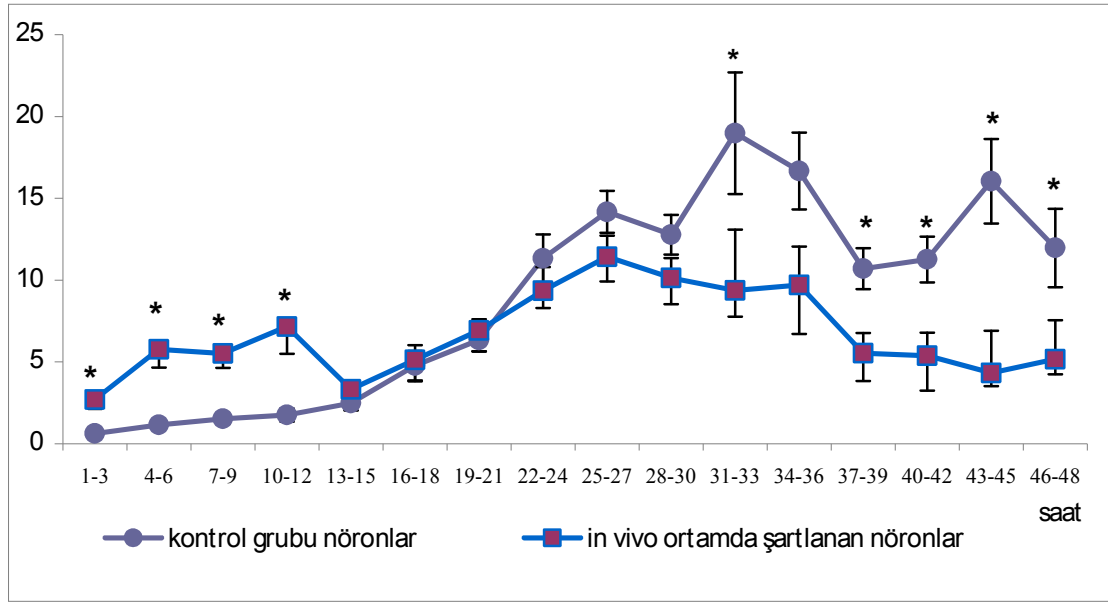
4.2. Şartlandırma Hasarı Deney Gruplarının Karşılaştırmalı Analizleri

Nitelik açısından; karşılaştırılmaları araştırılan şartlandırma etkisi için, açıklayıcı olabilecek gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapıldı. Deney grupları arasındaki fark $P<0.05$ 'e göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyona daha hızlı başladıkları, kontrol grubu nöronların hızlarının ise kademeli olarak artarak 24. saatte bu iki grubun hızlarının eşit seviyeye ulaştığı ve ikinci 24 saatte ise bu iki grubun hızlarının benzer bir davranış sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.60). Bu iki grubun rejenerasyon aktiviteleri karşılaştırıldığında: yine in vivo şartlanan nöronların kontrol grubu nöronlara oranla ilk 24 saat yüksek bir aktivite sergilediği, ancak bu aktivitenin ikinci 24 saatte azaldığı gözlemlendi (Şekil 4. 61).

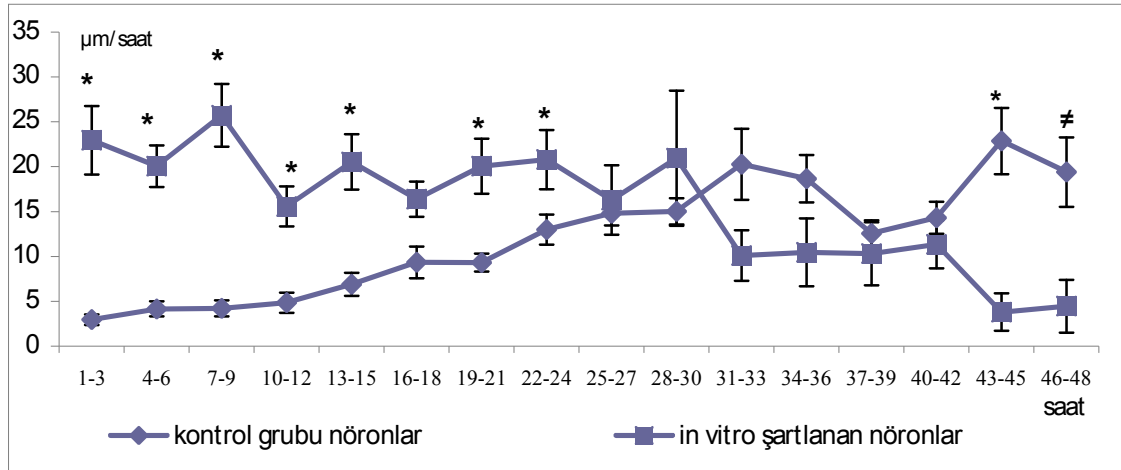


Şekil 4.60. Kontrol grubu hücrelerle in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

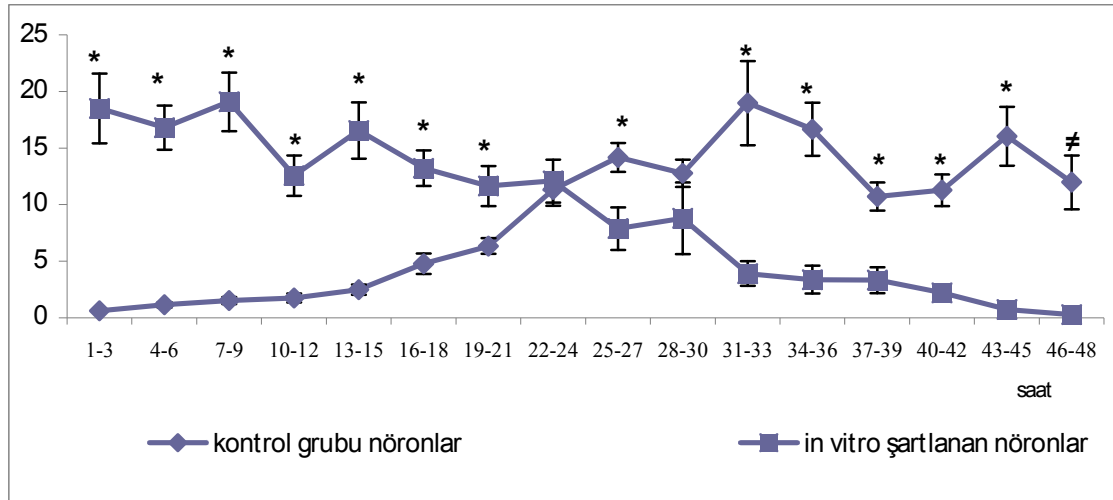


Şekil 4.61. Kontrol grubu hücrelerle in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

Kontrol grubu nöronlar ile in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hız ve aktiviteleri karşılaştırıldığında in vitro şartlanan nöronların kontrol grubu nöronların aksine yüksek seviyede hız ve aktivite ile rejenerasyona başladıktan sonra azaldığı ancak kontrol grubu nöronların ise rejenerasyona düşük seviyeli hız ve aktivite ile başladığı fakat daha sonra hız ve aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Ayrıca bu iki grubun rejenerasyon hız ve aktivitesinin 24. saat civarında eşitlendiği saptandı (Şekil 4.62, 4.63).



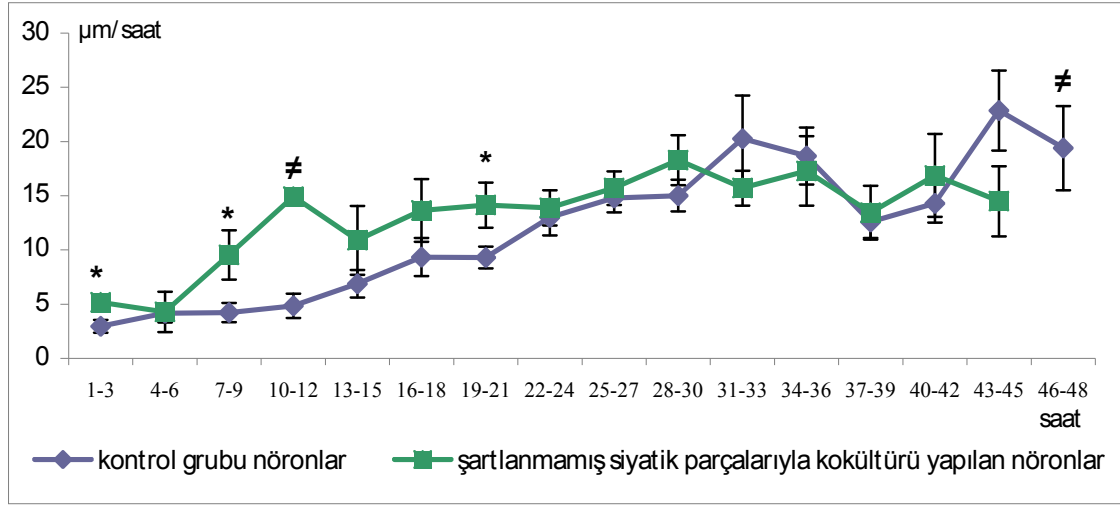
Şekil 4.62. Kontrol grubu nöronlar ile in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



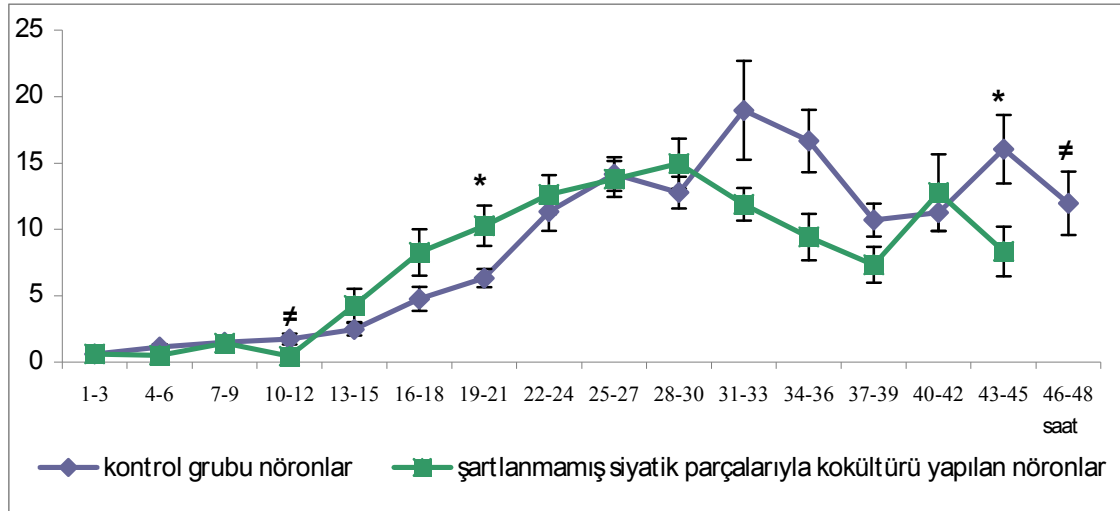
Şekil 4.63. Kontrol grubu nöronlar ile in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların hem rejenerasyon hızlarının hem de rejenerasyon aktivitelerinin benzer bir tablo sergileyerek; her iki grup nöronun da rejenerasyona yavaş bir hız ve aktivite ile

başlayarak 48. saate kadar kademeli olarak hız ve aktivitelerini arttırdıkları gözlemlendi (Şekil 4.64, 4.65).

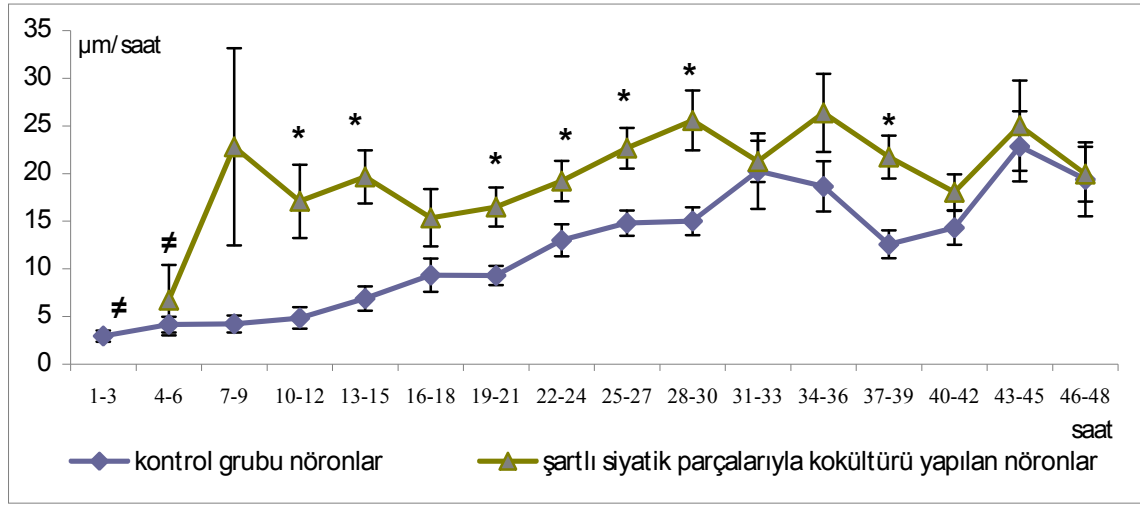


Şekil 4.64. Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

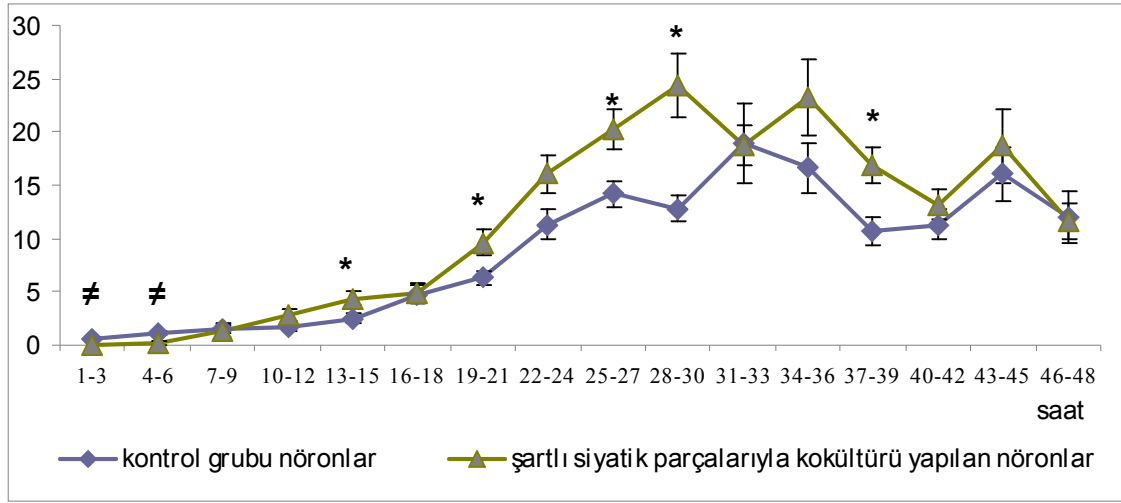


Şekil 4.65. Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Kontrol grubu nöronlar ile şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar karşılaştırıldığında: bu grupların da benzer bir rejenerasyon hız ve aktivite davranışı sergiledikleri gözlemlendi. Ancak; şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların kontrol grubu nöronlara göre hızının daha yüksek seviyede olduğu, ilk 24 saatte bu iki grubun rejenerasyon aktivitelerinin eşit olduğu, fakat şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların ikinci 24 saatte kontrol grubu nöronlara oranla daha aktif oldukları saptandı (Şekil 4.66, 4.67)

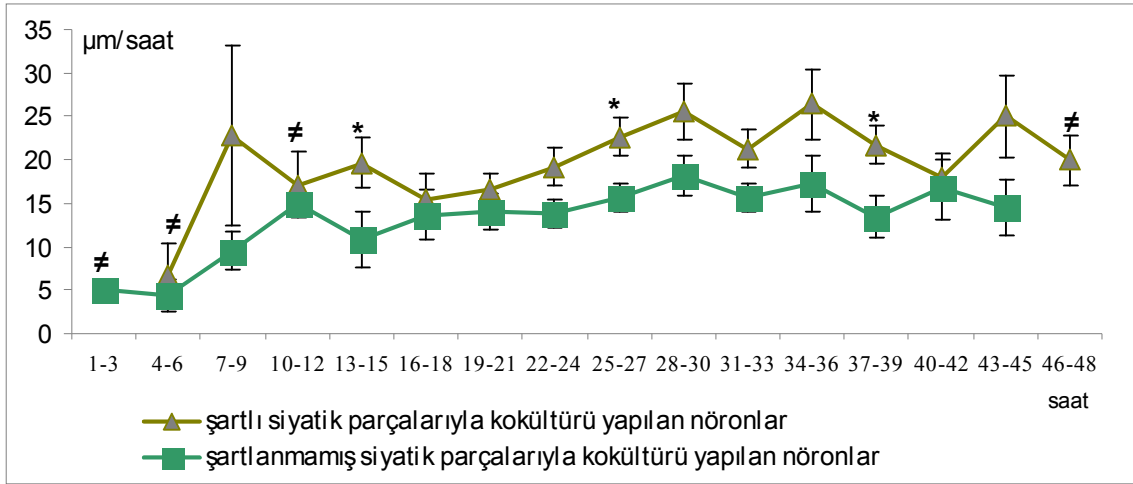


Şekil 4.66. Kontrol grubu nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçaları ile kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

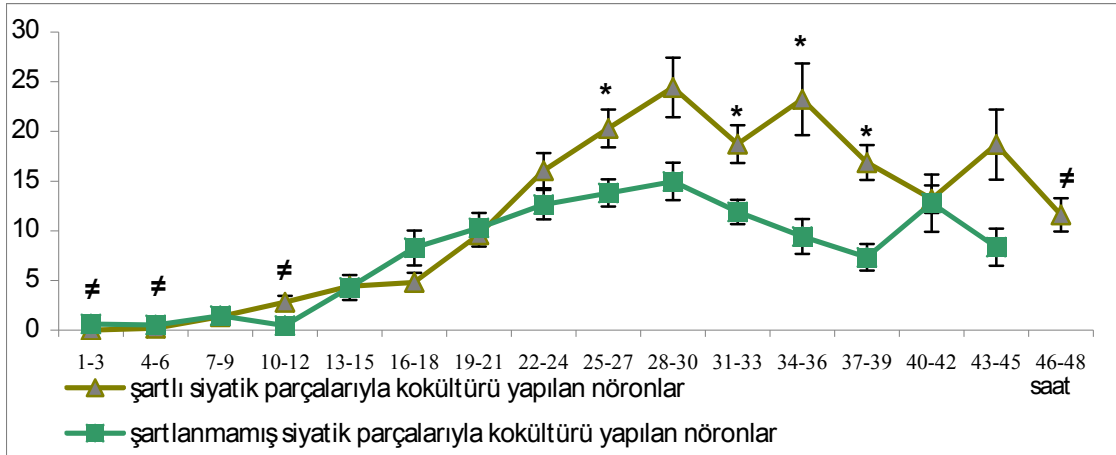


Şekil 4.67. Kontrol grubu nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçaları ile kokültürü yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların benzer bir rejenerasyon hızına sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.68). Bu iki grubun rejenerasyon aktivitelerinin ilk 24 saat eşit seviyede olduğu, ancak ikinci 24 saatte şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların aktivitelerinin daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.69).



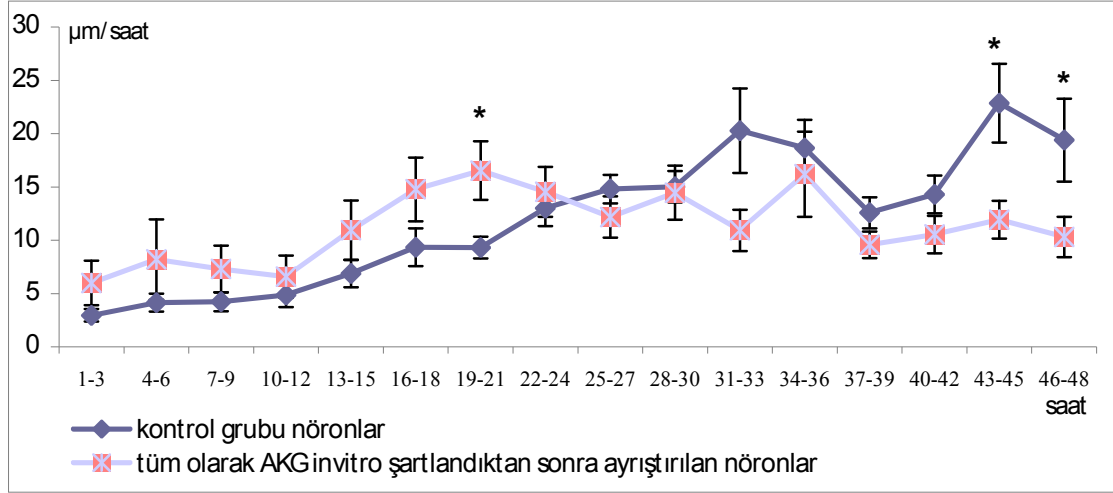
Şekil 4.68. Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, ≠: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



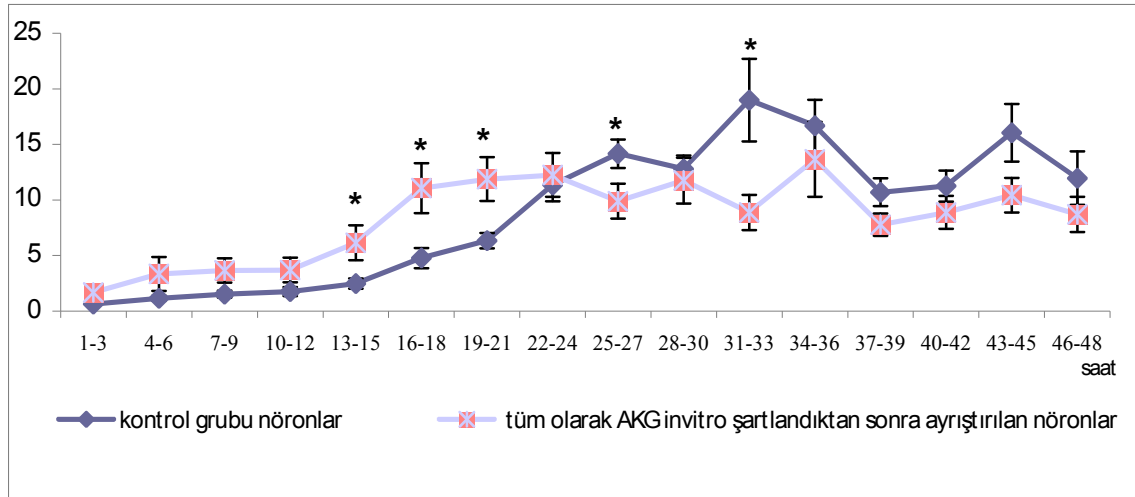
Şekil 4.69. Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ile şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, ≠: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Kontrol grubu nöronlar ile arka kök ganglionları bütün olarak in vitro ortamda şartlandıktan sonra, ayrıştırılan nöronların 48 saat boyunca benzer hız ve aktivite ile

rejenere oldukları ve bu iki grubun rejenerasyon hız ve aktivitelerinin 24. saatte eşitlendiği gözlemlendi (Şekil 4.70, 4.71).

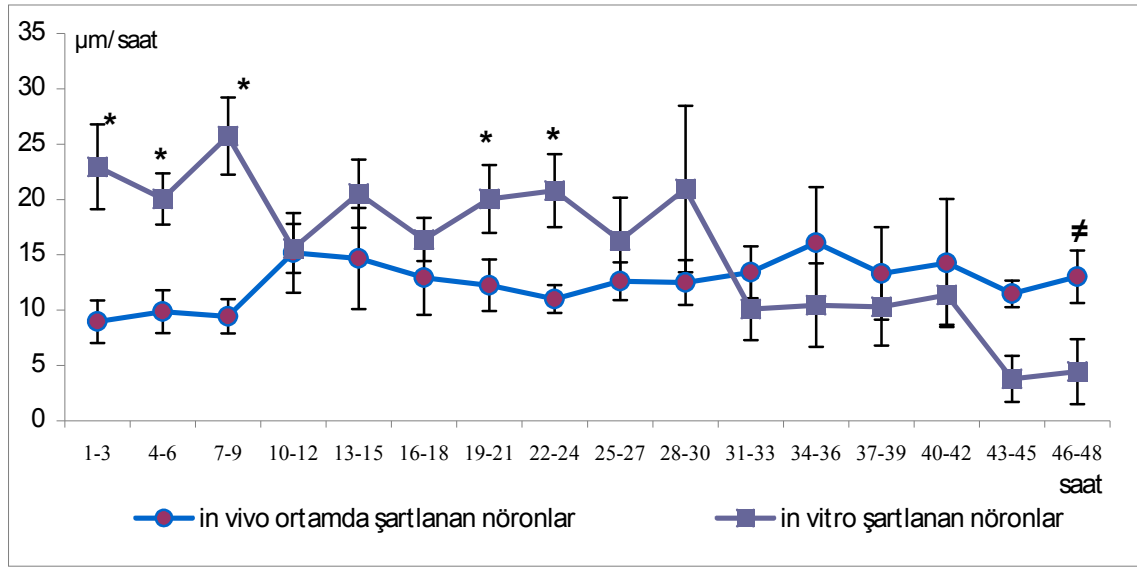


Şekil 4.70. Kontrol grubu nöronlar ile arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

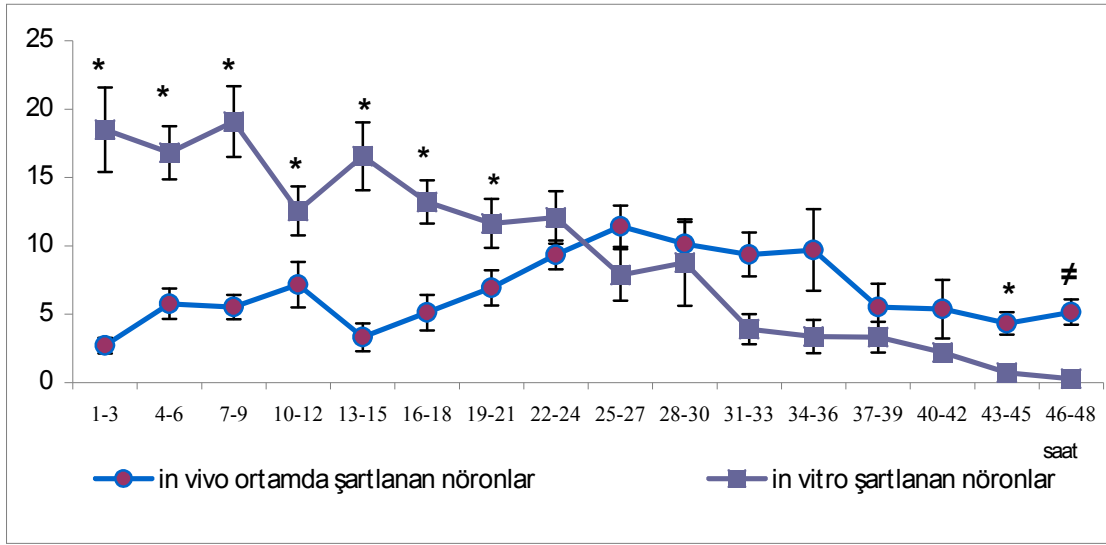


Şekil 4.71. Kontrol grubu nöronlar ile arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro ortamda şartlanan nöronlar karşılaştırıldığında; in vitro şartlanan nöronların in vivo ortamda şartlanan nöronlara göre daha yüksek hız ve aktivite ile rejenerasyona başlamalarına rağmen, bu hız ve aktivitenin azaldığı, bunun yanında in vivo ortamda şartlanan nöronların hız ve aktivitesinin 48 saat boyunca in vitro şartlanan nöronlara oranla daha istikrarlı bir tablo çizdiği gözlemlendi (Şekil 4.72, 4.73).

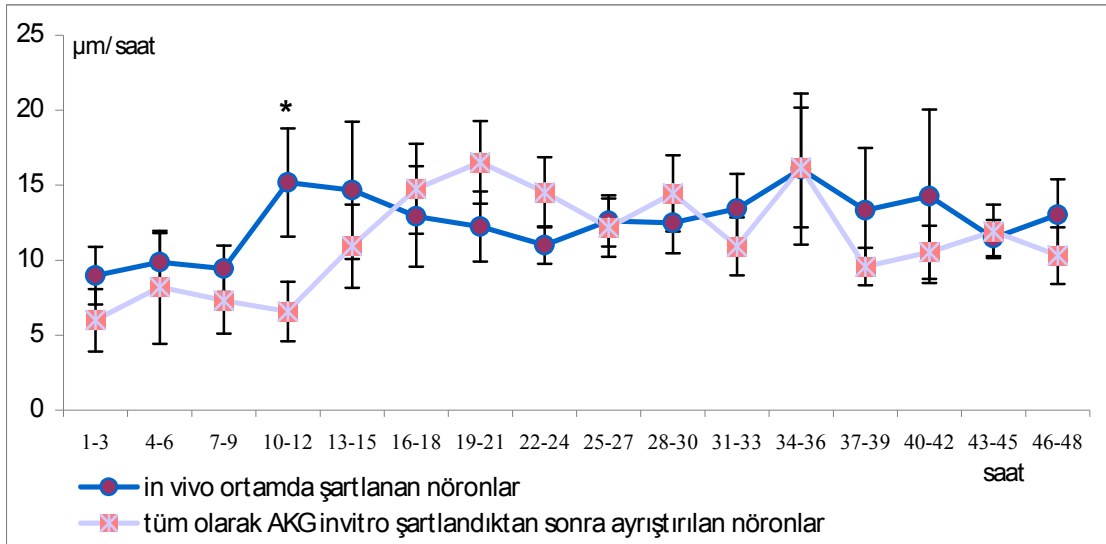


Şekil 4.72. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

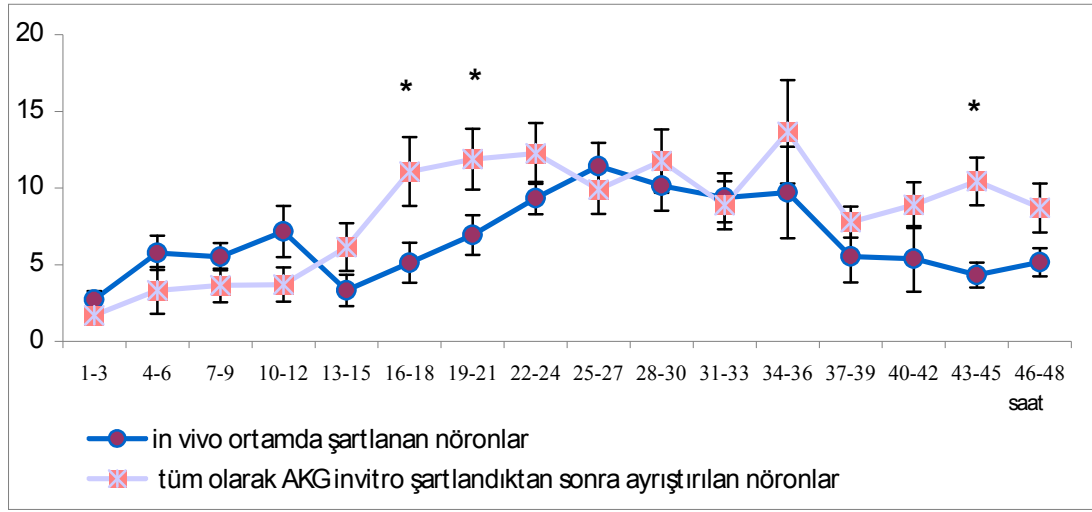


Şekil 4.73. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İN vivo ortamda şartlanan nöronlarla arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların, 48 saat boyunca benzer bir hız ve aktivite ile rejenere oldukları ve rejenerasyon hızlarının 36. saatte eşitlendiği gözlemlendi (Şekil 4.74, 4.75).

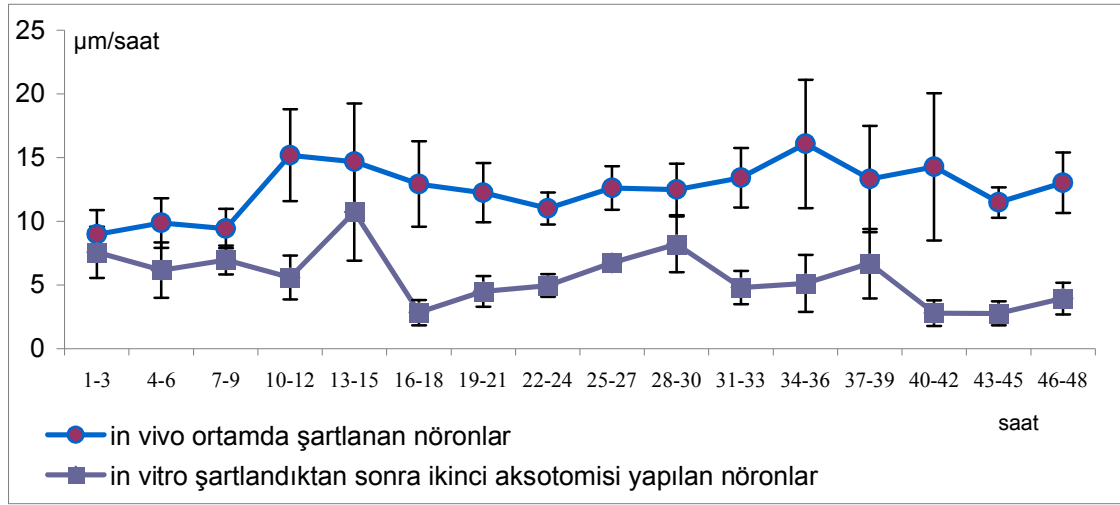


Şekil 4.74. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

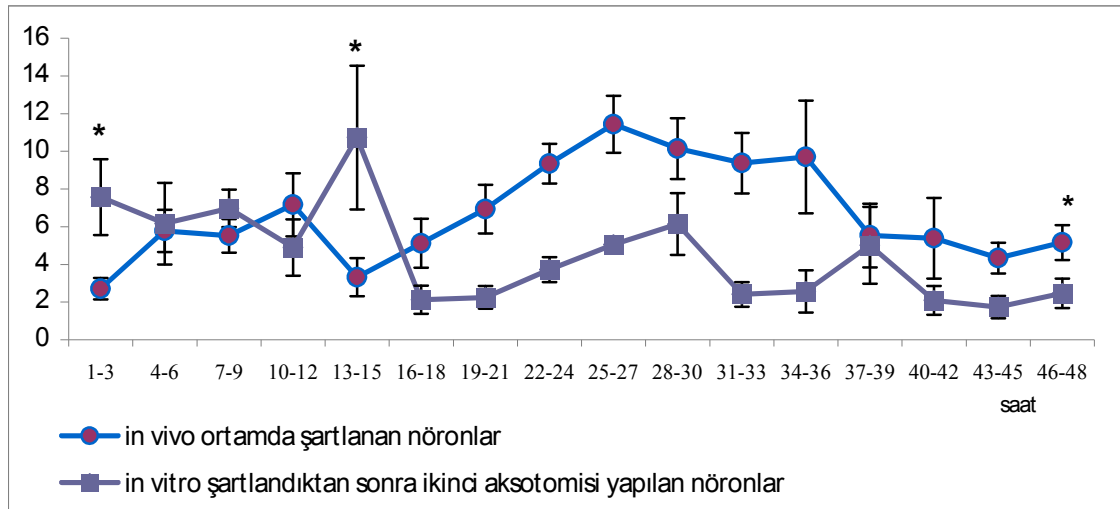


Şekil 4.75. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

İN vivo ortamda şartlanan nöronların in vitro şartlandıktan sonra aksotomiye uğrayan nöronlara oranla daha yüksek bir hızla rejenerasyon oldukları gözlemlendi (Şekil 4.76). İn vivo ortamda şartlanan nöronlar en yüksek rejenerasyon aktivitesine 24. saat civarında ulaşırken, AKG in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların maksimum aktiviteye 12. saat civarında ulaştıkları, ikinci 24 saatte ise bu iki grubun aktivitesinin benzer bir şekilde azalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.77).



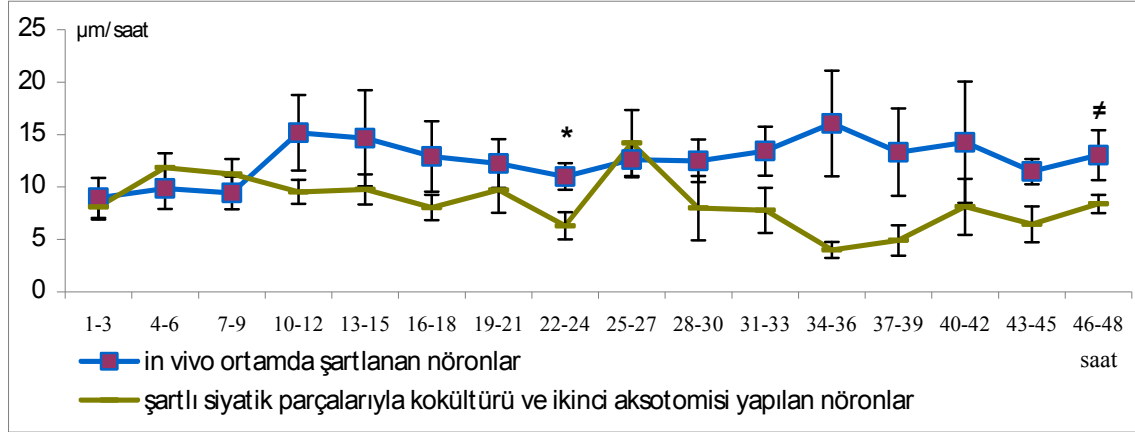
Şekil 4.76. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlandıktan sonra aksotomiyeye uğrayan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).



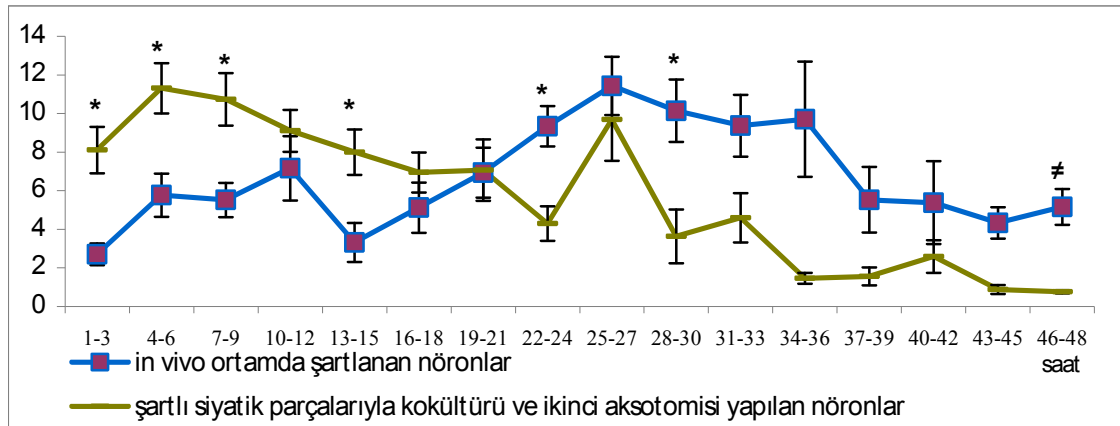
Şekil 4.77. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlandıktan sonra aksotomiyeye uğrayan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

İN vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronlar karşılaştırıldığında: her iki grubun da eşit hızla rejenerasyona başladığı, in vivo şartlanan nöronlar stabil hızla rejenerasyon olurken; şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının düzensiz bir azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.78). Şartlanmış siyatik

parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların in vivo şartlanan nöronlara oranla daha yüksek bir aktivite ile rejenerasyona başladıkları, ancak bu aktivitenin ilk 24 saatte azaldığı, in vivo şartlanan nöronların ise tam tersine 24. saatte en yüksek aktiviteye ulaştığı gözlemlendi. İkinci 24 saatte ise; her iki grup nöronun aktivitesinde azalmanın olduğu saptandı (Şekil 4. 79).

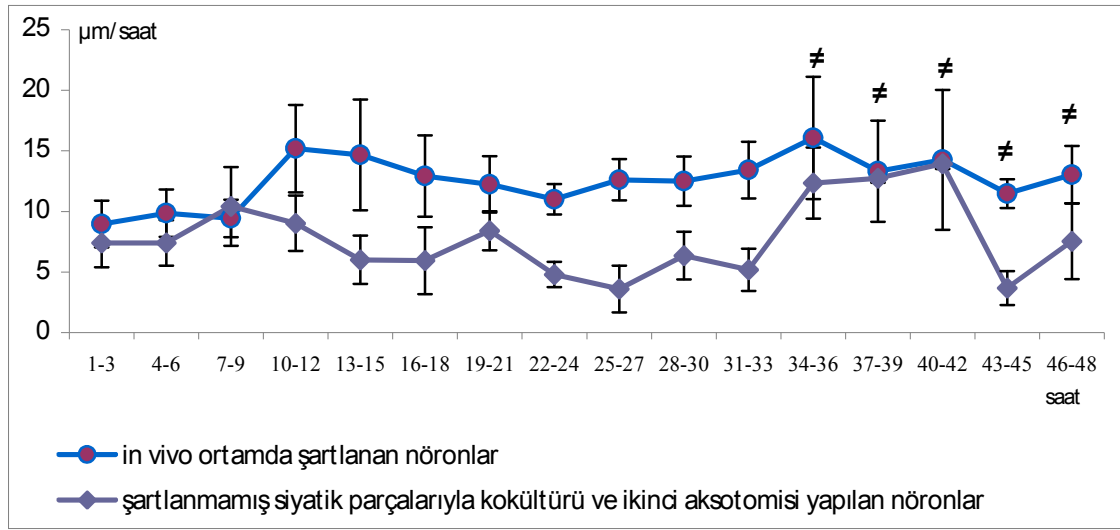


Şekil 4.78. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

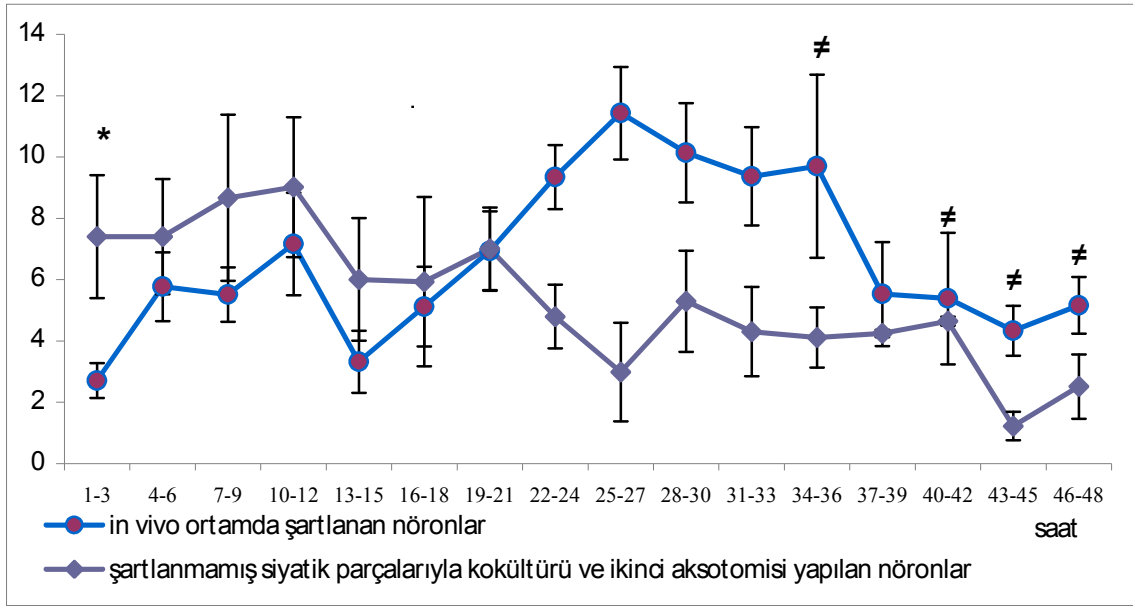


Şekil 4.79. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronlar karşılaştırıldığında: in vivo şartlanan nöronların daha stabil bir hızla rejenere oldukları, ancak şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların hızının ilk 24 saatte azaldığı, ikinci 24 saatte ise bu hızın artmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.80). İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi ilk 24 saatte artarken, şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların aktivitesinin azaldığı, her iki grubun aktivitesinin ikinci 24 saatte benzer bir azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4. 81).

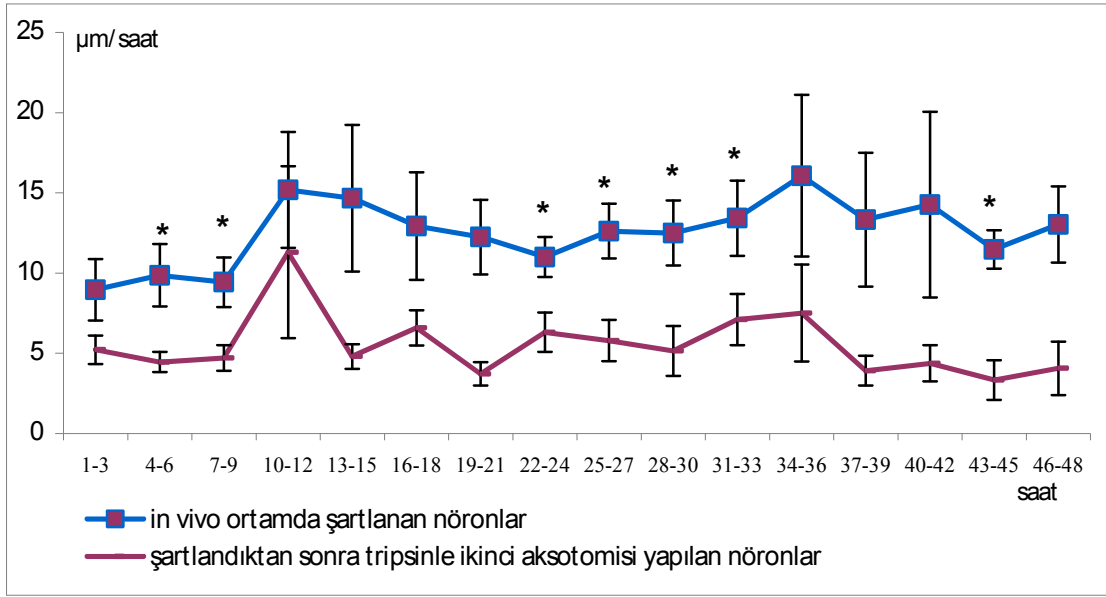


Şekil 4.80. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

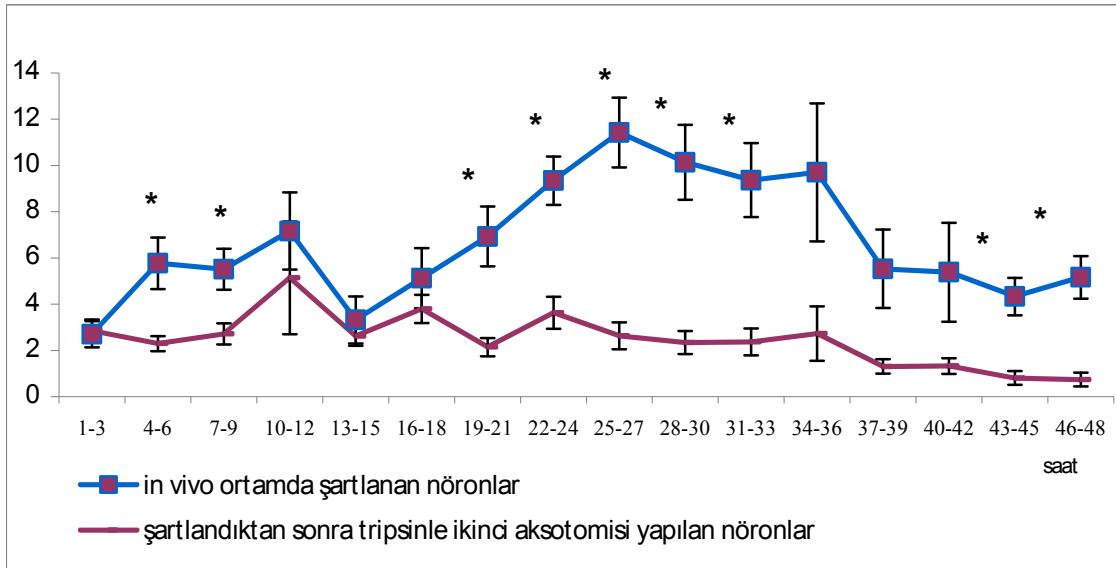


Şekil 4.81. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlandıktan sonra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronlar karşılaştırıldığında; her iki gruptaki nöronların benzer bir rejenerasyon davranışı sergiledikleri, ancak in vivo ortamda şartlanan nöronların daha yüksek düzeyde bir hızla rejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 4.82). İn vivo ortamda şartlanan nöronların aktivitesinin ilk 24 saatte arttığı, ikinci 24 saatte ise kademeli olarak azaldığı, bunun yanı sıra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronların aktivitesinin 48 saat boyunca daha stabil ve azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.83).

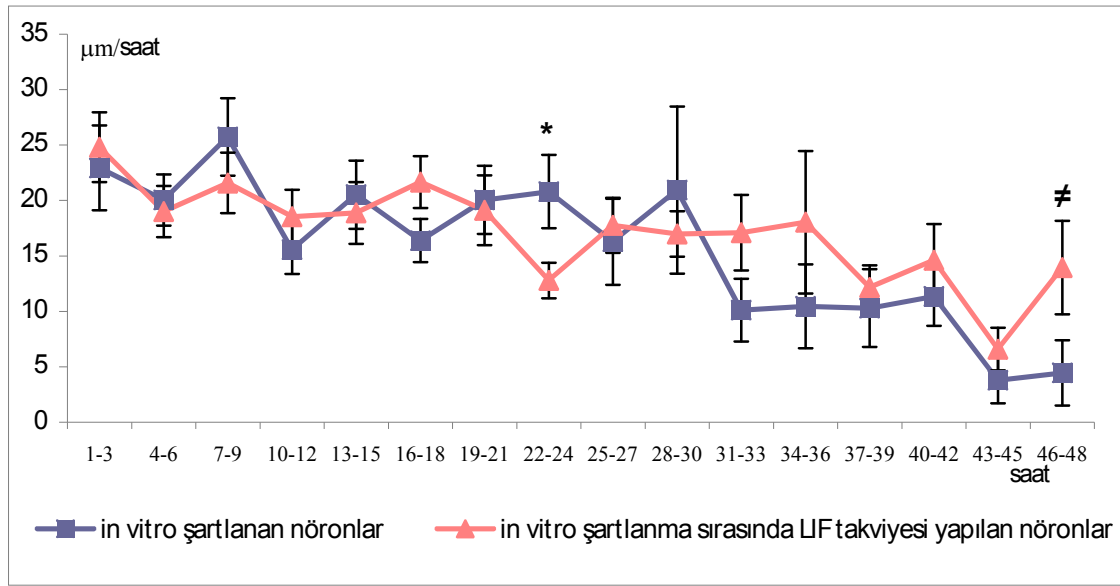


Şekil 4.82. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlandıktan sonra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

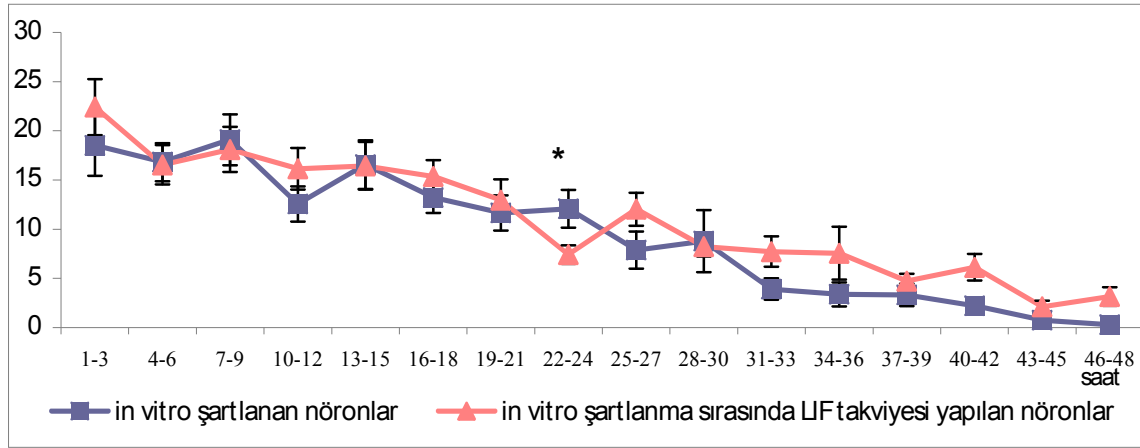


Şekil 4.83. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla şartlandıktan sonra tripsinle ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

İn vitro olarak şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlar karşılaştırıldığında her iki grubun da aynı hızla rejenerasyona başladıkları ve benzer bir rejenerasyon davranışı sergiledikleri gözlemlendi. Ancak; in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların 48. saate yaklaştıkça in vitro şartlanan nöronlara oranla hızlarının artmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.84). Bu iki grup nöronun benzer bir rejenerasyon aktivitesi davranışı sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 4.85).

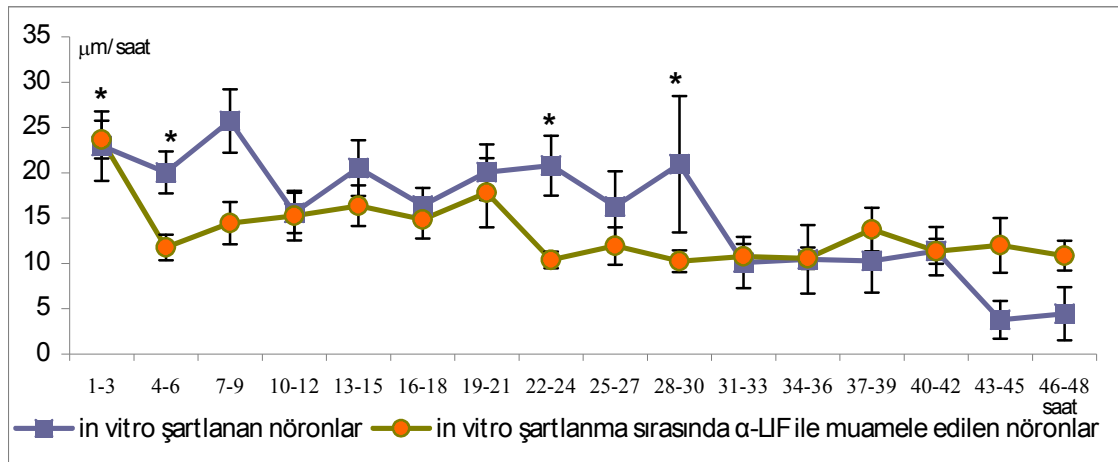


Şekil 4.84. İn vitro şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

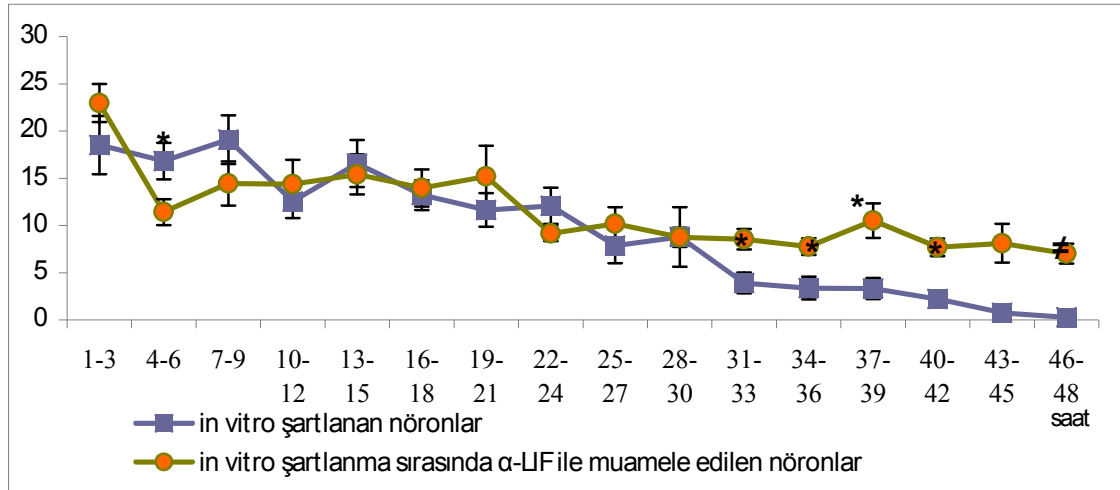


Şekil 4.85. İn vitro olarak şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

İn vitro ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar karşılaştırıldığında, her iki grubun rejenerasyon hız ve aktivite davranışının benzer olduğu, ancak 48. saate yaklaştıkça in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların daha yüksek rejenerasyon hız ve aktivitesine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.86, 4.87).

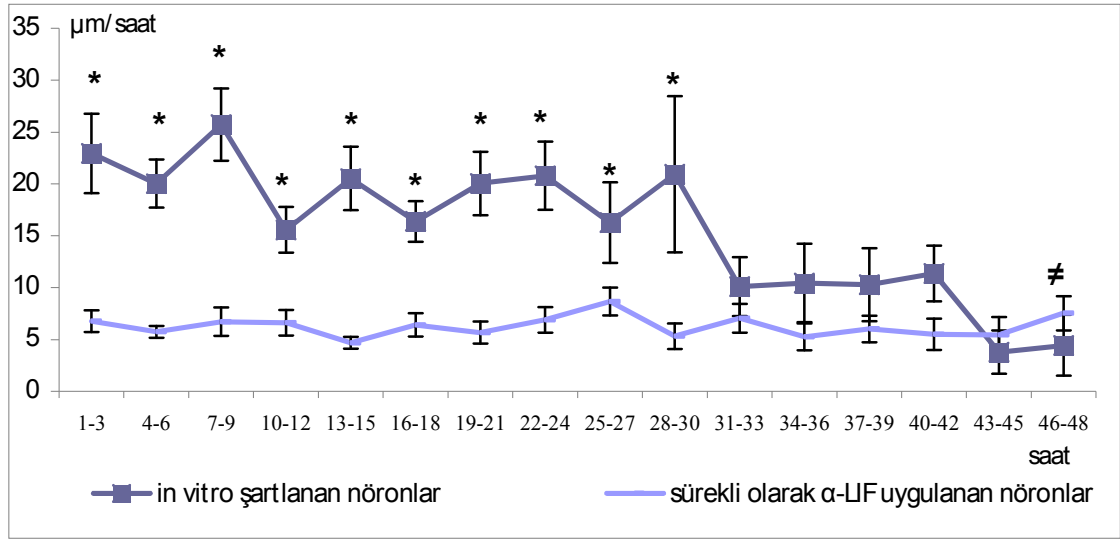


Şekil 4.86. İn vitro ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

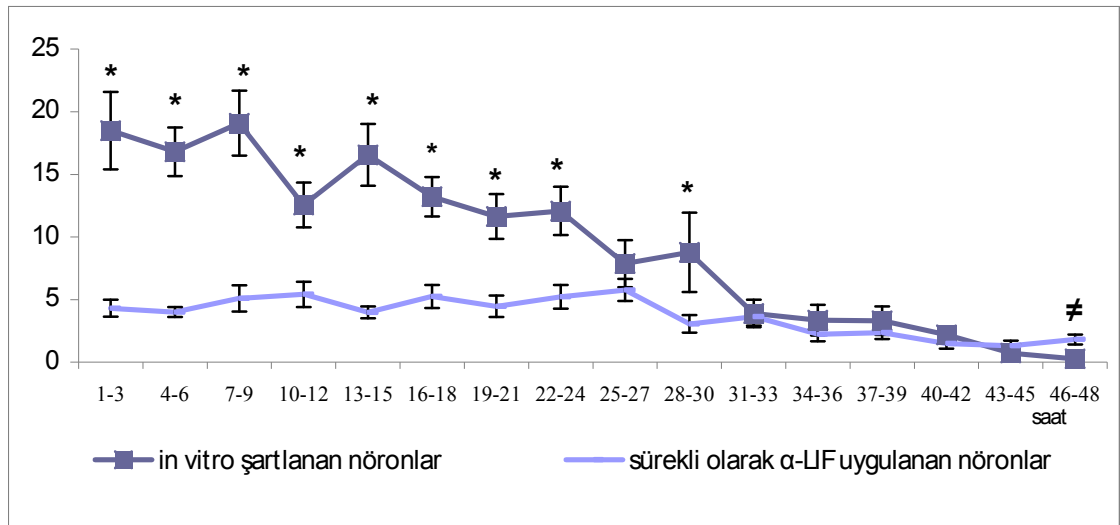


Şekil 4.87. İn vitro ortamda şartlanan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro olarak şartlanan nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronlar karşılaştırıldığında; in vitro şartlanan nöronların rejenerasyon hız ve aktivitelerinin kademeli olarak azaldığı, buna karşın sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların 48 saat boyunca in vitro şartlı nöronlara göre daha düşük düzeyde, ancak stabil rejenerasyon hız ve aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.88, 4.89).



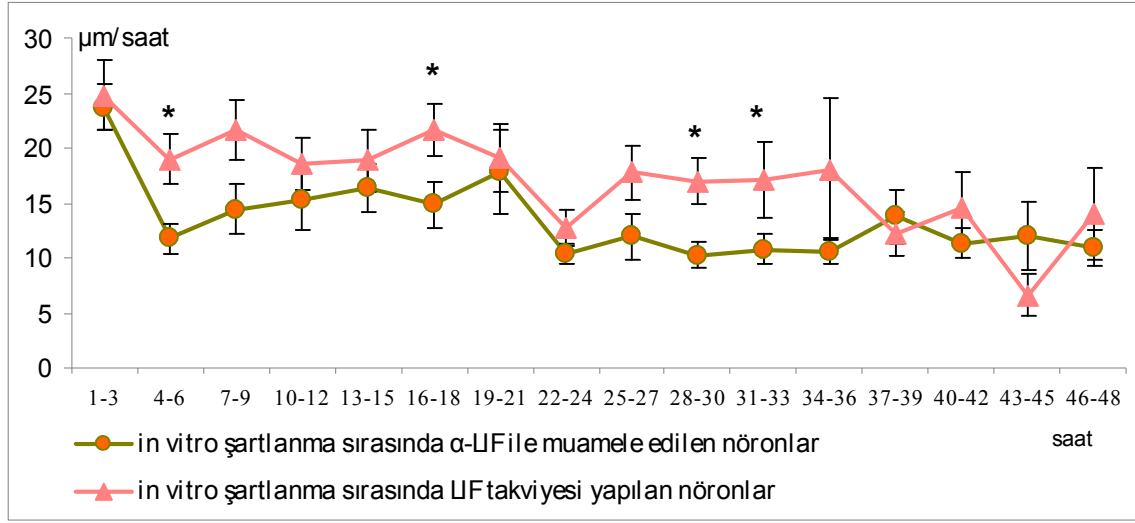
Şekil 4.88. İn vitro şartlanan nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



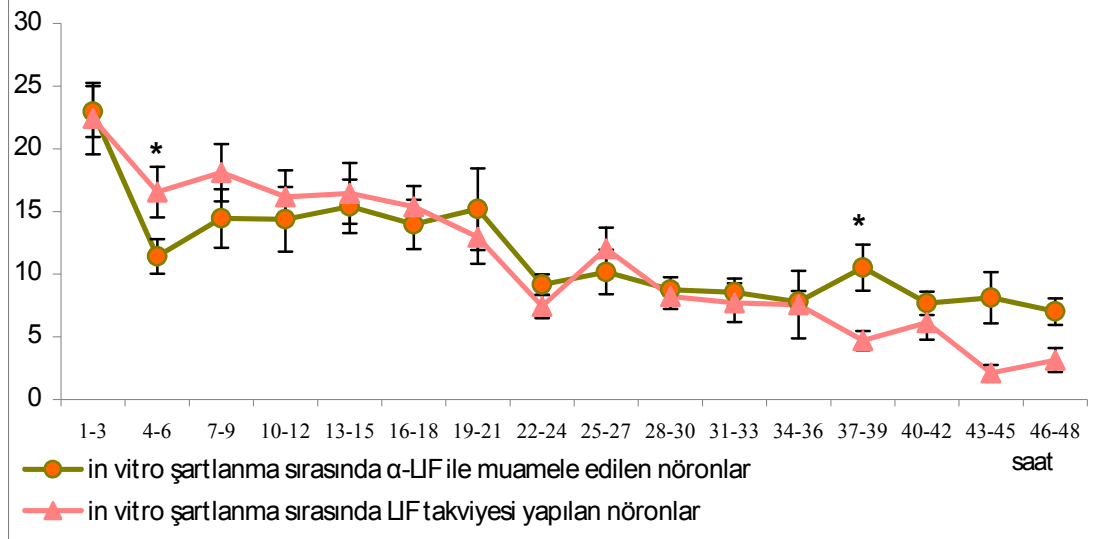
Şekil 4.89. İn vitro şartlanan nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İN vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlar ile, in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar karşılaştırıldığında: iki grubun rejenerasyon hız ve aktivitesinin benzer bir rejenerasyon davranışı sergilediği, ancak in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hız ve

aktivitesinin in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların hız ve aktivitesine göre ilk saatlerde daha fazla azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.90, 4.91).



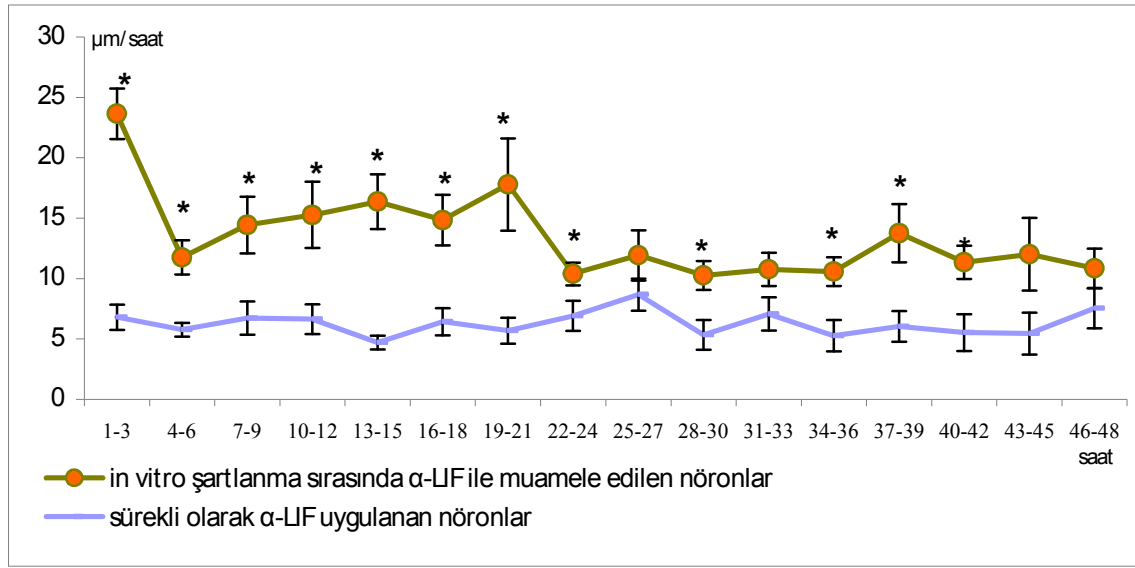
Şekil 4.90. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).



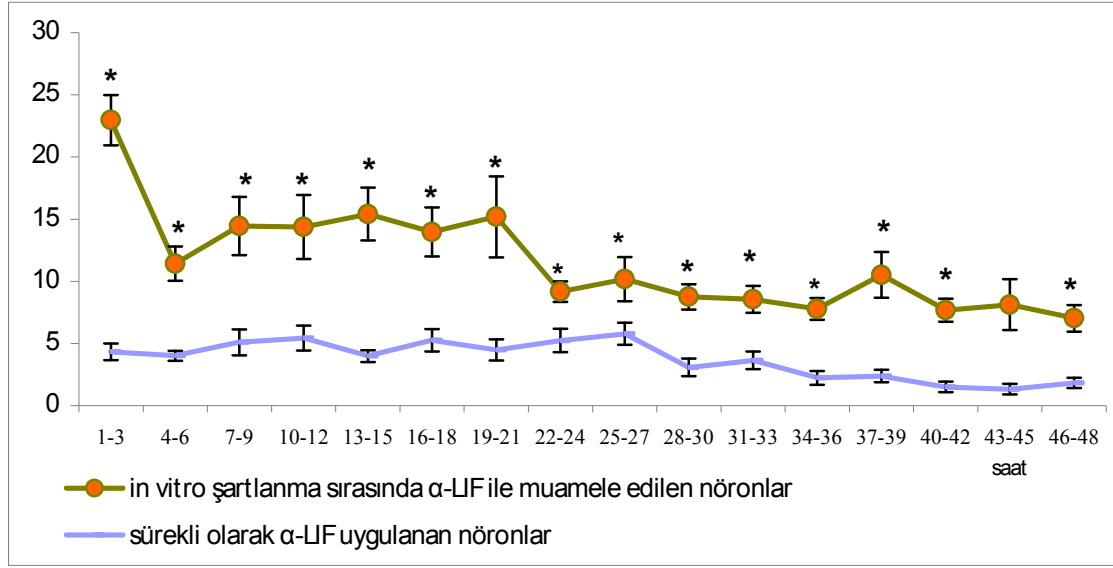
Şekil 4.91. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlarla in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar ile sürekli olarak Anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronlar karşılaştırıldığında; in vitro şartlanma

sırasında Anti-LIF ile muamele edilen nöronların oldukça yüksek bir hız ve aktivite ile rejenerasyona başladıkları 3 saat sonra bu hız ve aktivitenin azaldığı gözlemlendi. Dördüncü saatten sonra in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlar ile sürekli olarak anti LIF uygulanan in vitro şartlı nöronların paralel bir rejenerasyon davranışı sergiledikleri ancak Anti-LIF ile muamele edilen nöronların daha yüksek seviyede bir rejenerasyon hız ve aktivitesine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.92, 4.93).

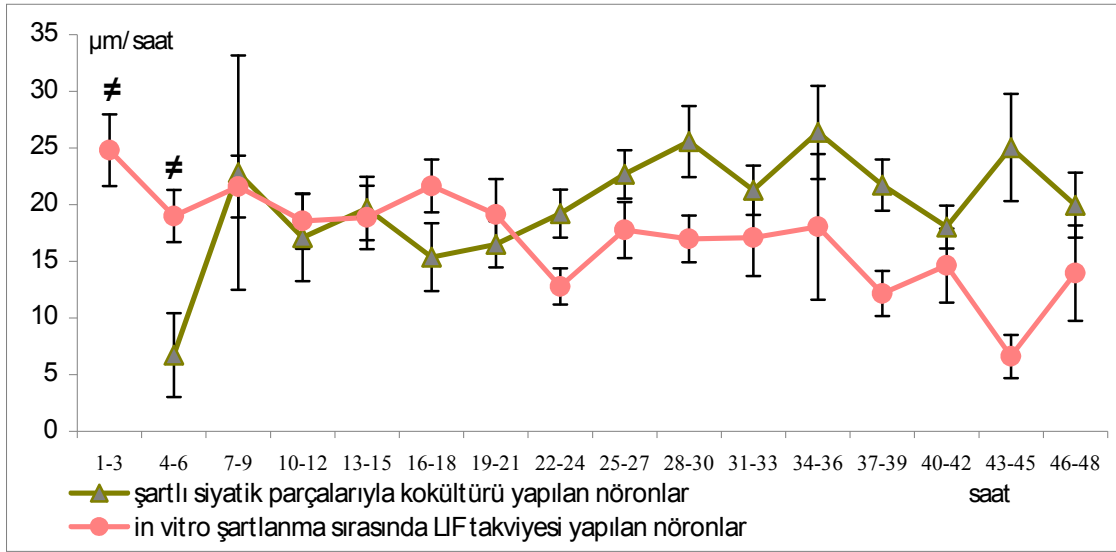


Şekil 4.92. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlarla sürekli olarak anti-LIF uygulanan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

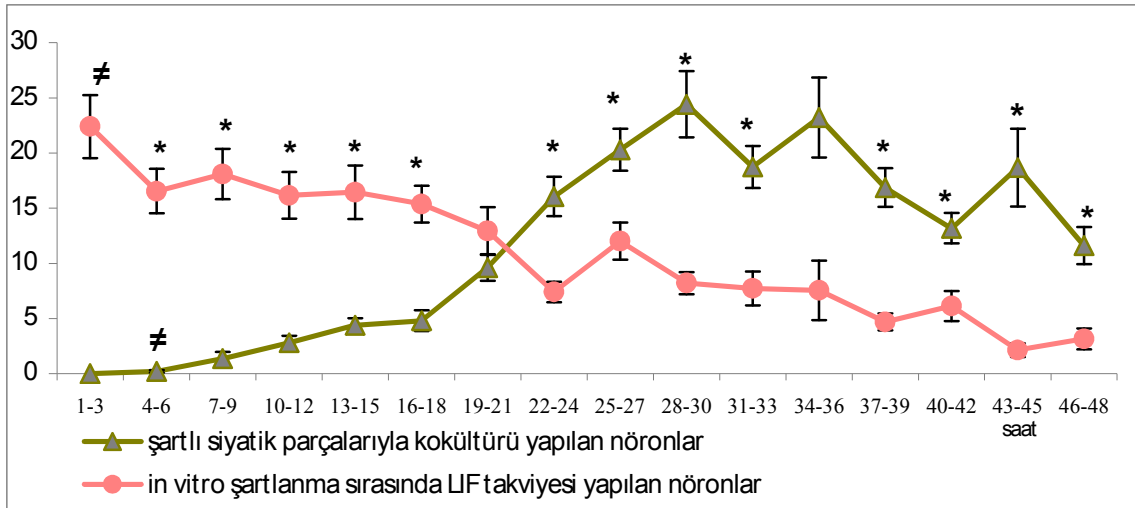


Şekil 4.93. İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronlarla sürekli olarak anti LIF uygulanan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların, düşük düzeyde hız ve aktivite ile rejenerasyona başlayarak, ilk 24 saatte hız ve aktivitelerinin arttığı, ikinci 24 saatte ise; düzensiz bir rejenerasyon davranışı sergileyerek rejenerasyon hız ve aktivitesinin azalmaya başladığı gözlenirken; in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyona daha yüksek seviyeli rejenerasyon hız ve aktivitesi ile başladığı, ancak; bu hız ve aktivitenin daha sonra kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.94, 4.95).

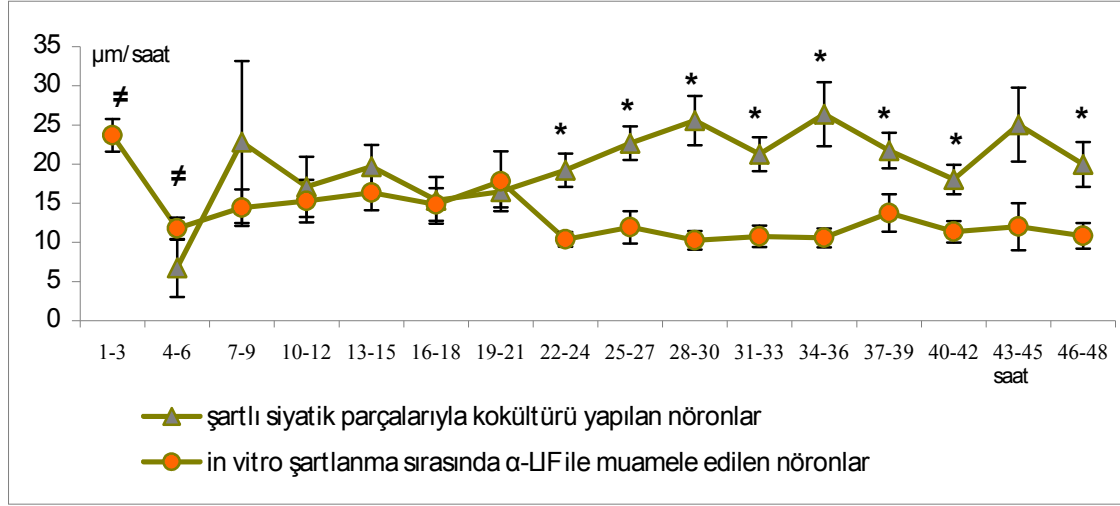


Şekil 4.94. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

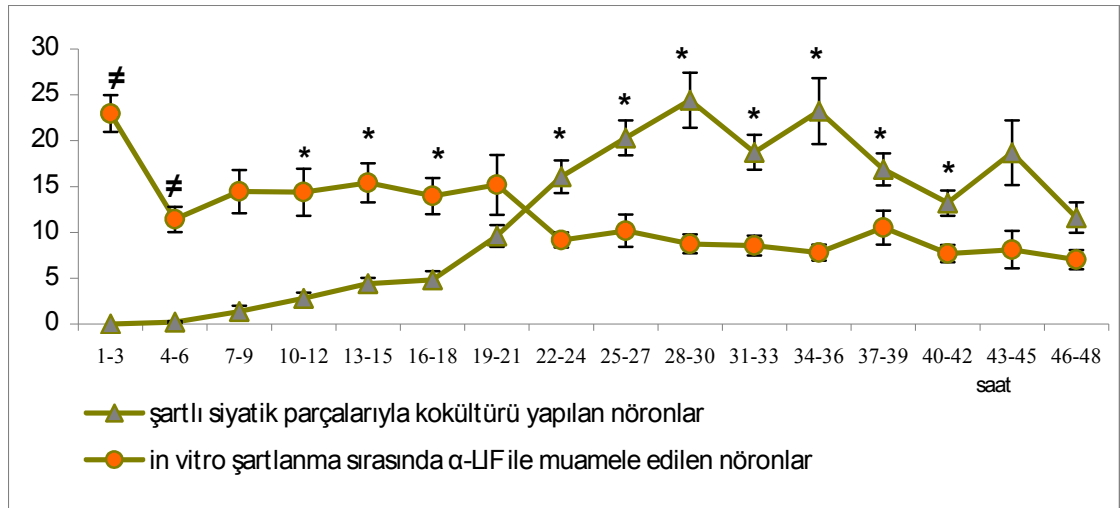


Şekil 4.95. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyona düşük bir hız ve aktivite ile başladıktan sonra, rejenerasyon hız ve aktivitesinin arttığı, bu gruptaki nöronların rejenerasyon davranışının tersine in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların yüksek bir hız ve aktivite ile rejenerasyona başlayıp daha sonra bu hız ve aktivitenin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.96, 4.97).

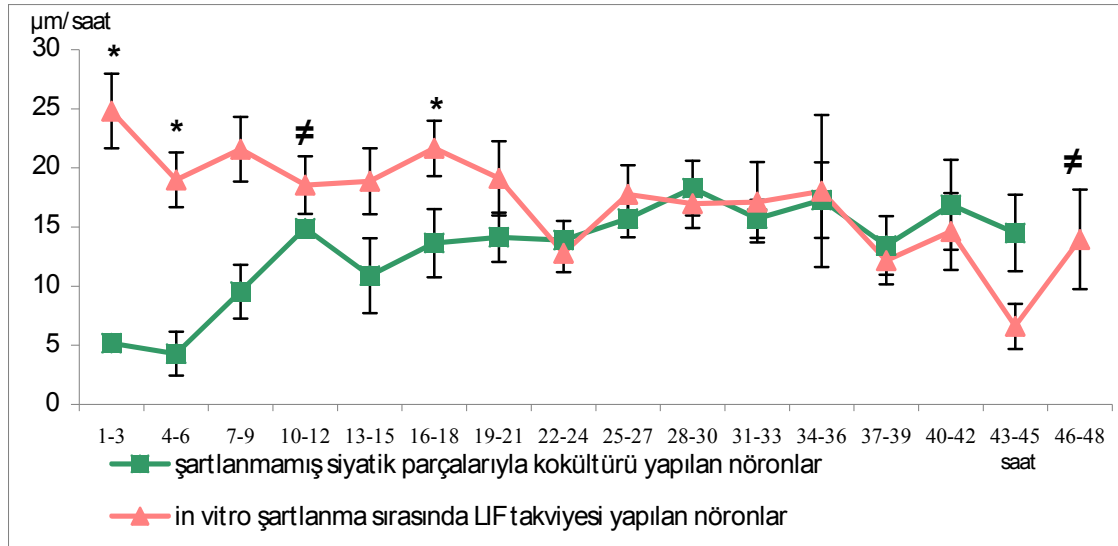


Şekil 4.96. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

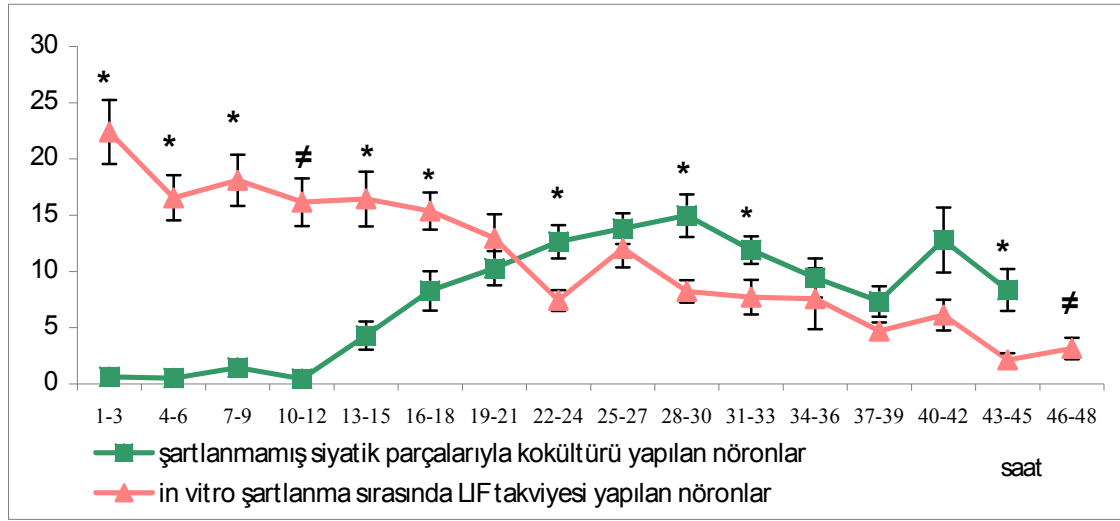


Şekil 4.97. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$).

İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyona daha hızlı başladıkları, ancak bu hızın daha sonra azaldığı, bunun yanı sıra şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların rejenerasyon hızının daha az olduğu, ancak hızını daha sonra kademeli olarak arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4. 98). Şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronlar ilk 12 saat minimal rejenerasyon aktivitesi gösterip daha sonra artış eğilimine girerken, in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların inkübasyona başladığı andan itibaren oldukça yüksek, ancak sürekli olarak azalan bir aktivite sergiledikleri, yaklaşık 24. saate gelindiğinde her iki gruptaki aktivitenin birbirine çok yaklaştığı ve inkübasyonun ikinci 24 saatinde rejenerasyon aktivitesindeki üstünlüğün genel olarak şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültür yapılan nöronlara geçtiği gözlemlendi (Şekil 4.99).

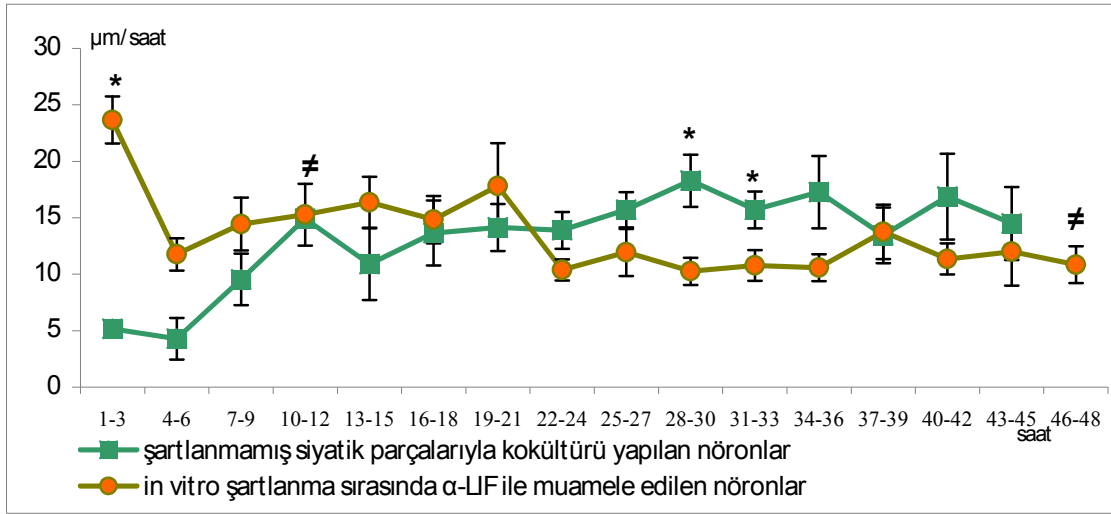


Şekil 4.98. Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

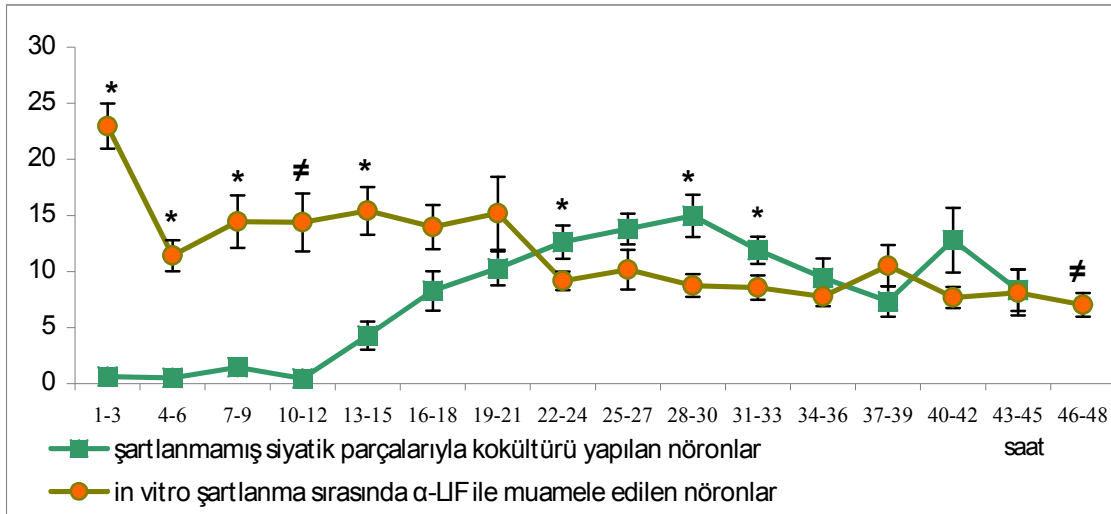


Şekil 4.99. Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların yüksek hız ve aktivite ile başladıkları, rejenerasyonun ilk 24 saatte azaldıktan sonra stabil olduğu, ancak şartlanmamış siyatik parçalarıyla kokültürü yapılan nöronların minimum hız ve aktiviteyle başladıkları, rejenerasyonun ilk 24 saatte kademeli olarak arttıktan sonra, ikinci 24 saatte daha düzensiz bir rejenerasyon hız ve aktivitesi sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 4.100, 4.101).



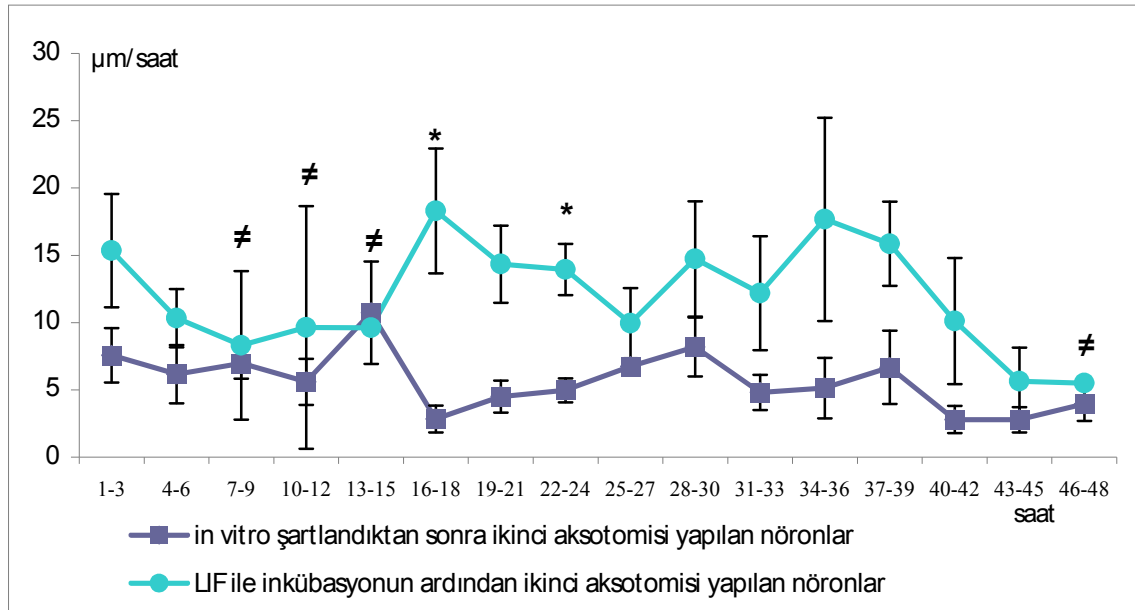
Şekil 4.100. Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



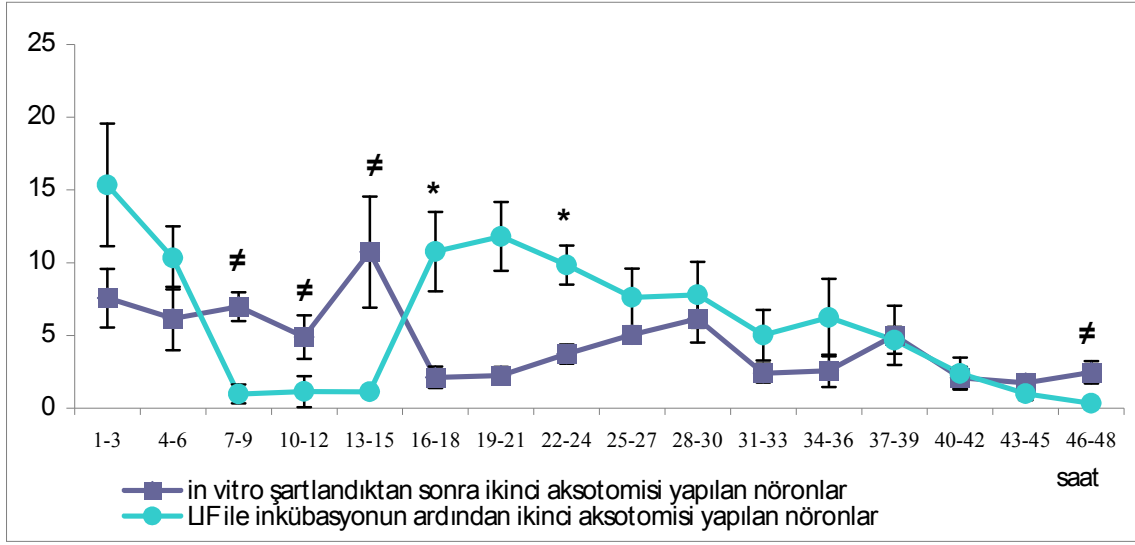
Şekil 4.101. Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü yapılan şartlanmamış nöronlar ile in vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların, rejenerasyon hız ve aktivitesinin düzensiz bir rejenerasyon davranışı ile azalma

eğiliminde olduğu, ancak LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyona diğer gruba göre daha hızlı başladıktan sonra azalmaya başladığı, her ne kadar 18. saatte kadar hızda artış meydana gelse de daha sonra düzensiz bir şekilde hızın azaldığı gözlemlendi. Ayrıca LIF ile inkübe edildikten sonra ikinci aksotomileri yapılan şartlanmamış nöronların aktivitesinin ilk 18 saatte oldukça farklı değişiklikler geçirdiği, bu nöronların ikinci 24 saatte in vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla paralel bir aktivite davranışı sergileyerek azalma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.102., 4.103).



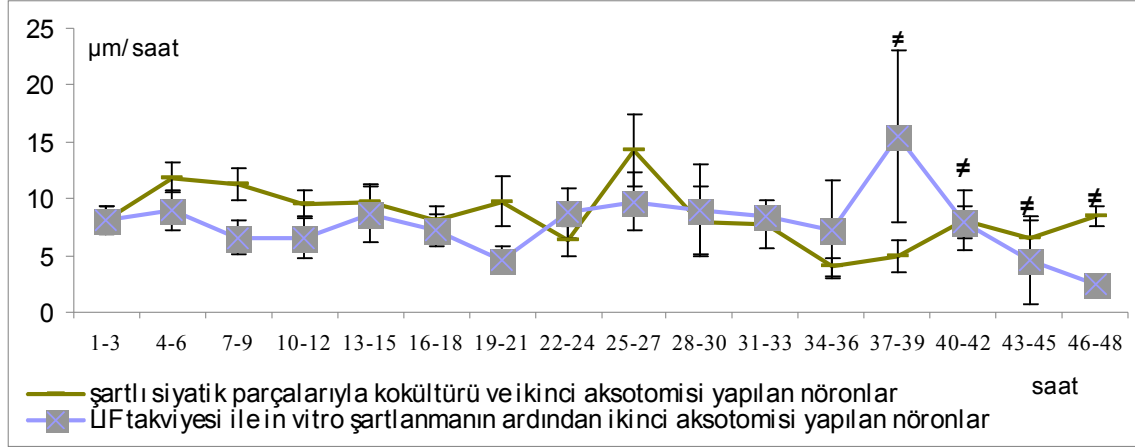
Şekil 4.102. İn vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



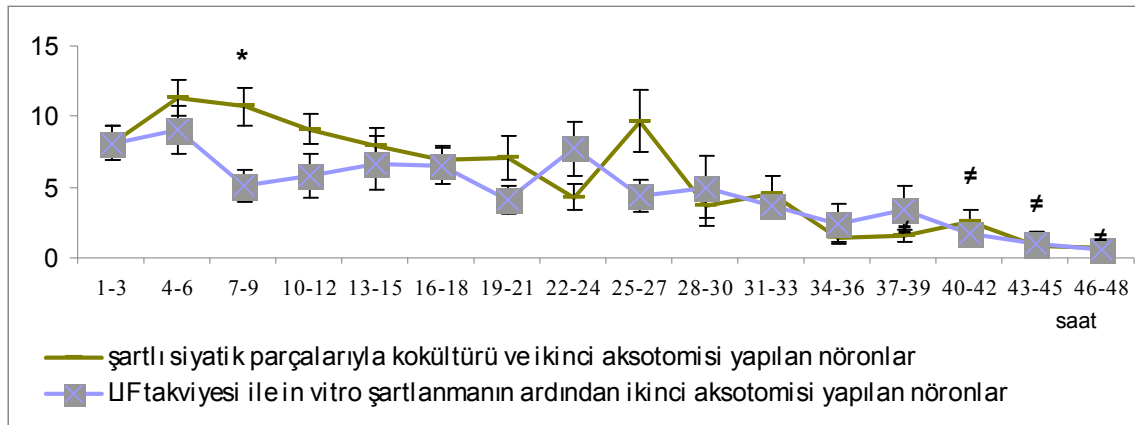
Şekil 4.103. İn vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ve in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyona aynı hızla başladıkları, ilk 24 saat hızlarının benzer olduğu, ancak 27. saatte şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla inkübe edilen ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların hızının aniden artarken; in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların hızının daha stabil olduğu ve bu grubun hızının da 39. saatte aniden arttığı, daha sonra iki grubun nöronlarının hızının benzer bir şekilde azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4. 104). Bu iki grubun rejenerasyon aktivitesinin genel olarak paralel bir tablo çizdiği, fakat 24. saatte in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitesinde ani bir artışın meydana geldiği, bunun yanı sıra şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların aktivitesinin ise azaldığı, 27. saatte gelindiğinde tam tersi bir durumun olduğu, şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların aktivitesinin artarken, diğer

gruptaki nöronların aktivitesinin azaldığı daha sonra 48. saate kadar ise her iki grubun aktivitesinin de paralel bir davranış sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.105).

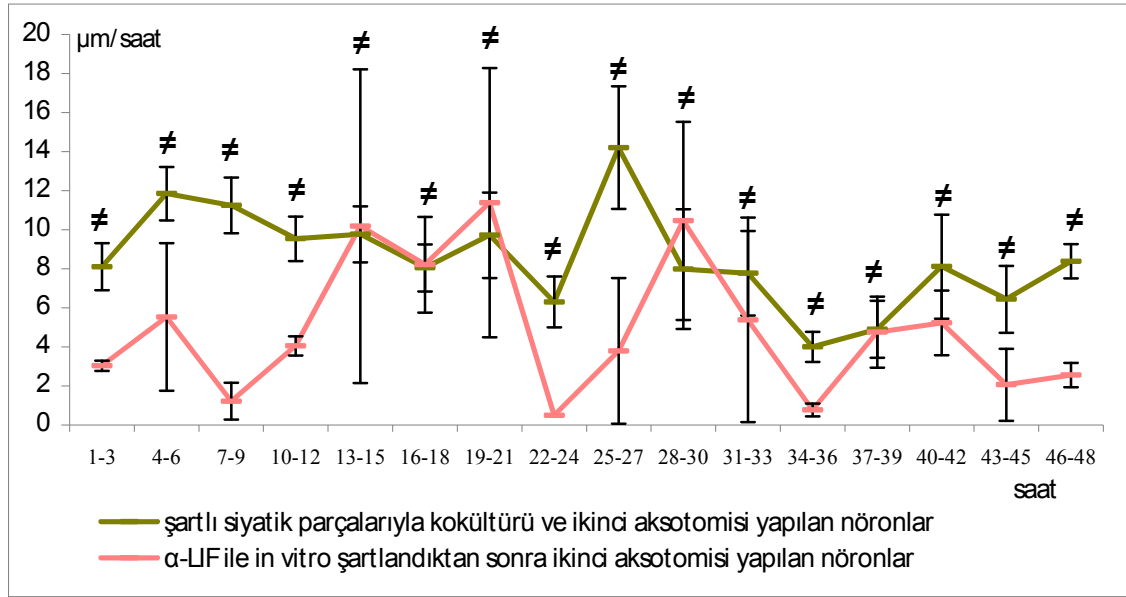


Şekil 4.104. Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

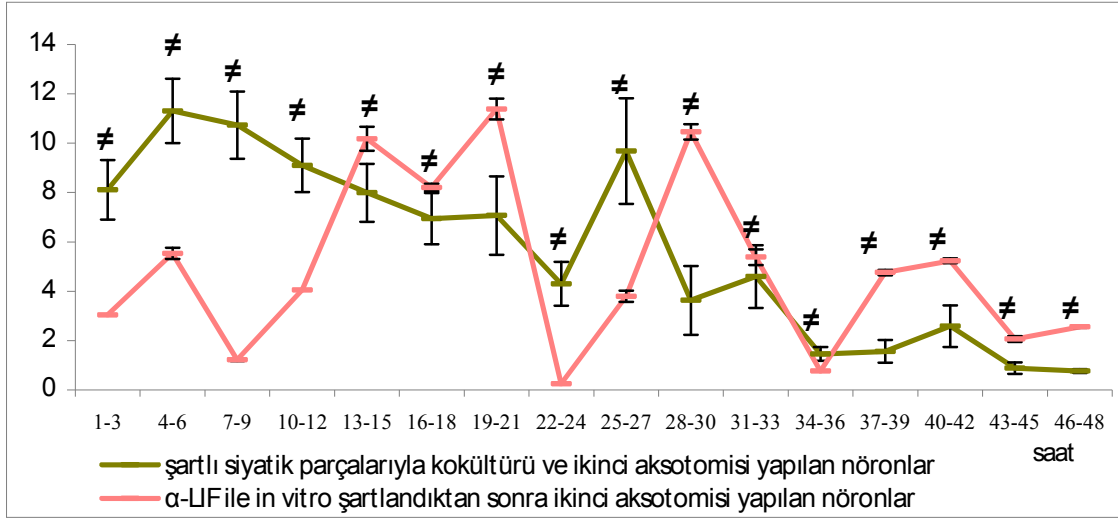


Şekil 4.105. Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro şartlanma sırasında anti-LIF ile muamele edilen nöronların gerek hızlarının gerekse aktivitelerinin ani artış ve düşüşlerden oluşan bir rejenerasyon davranışı sergilediği, buna karşın şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyona daha yüksek hız ve aktiviteyle başladığı ve daha stabil bir tablo çizdiği gözlemlendi. Ayrıca 24. saat civarında şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların hız ve aktivitelerinde ani artışın ve diğer gruptaki nöronların hız ve aktivitesinde gözlenen ani azalma da dikkat çekici bir bulgudur (Şekil 4. 106., 4.107).

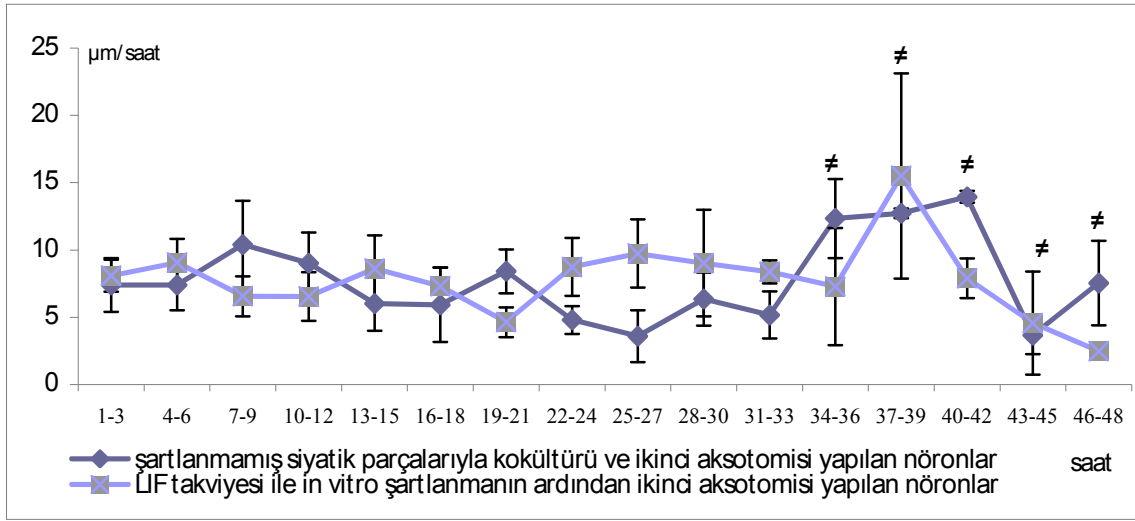


Şekil 4.106. Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

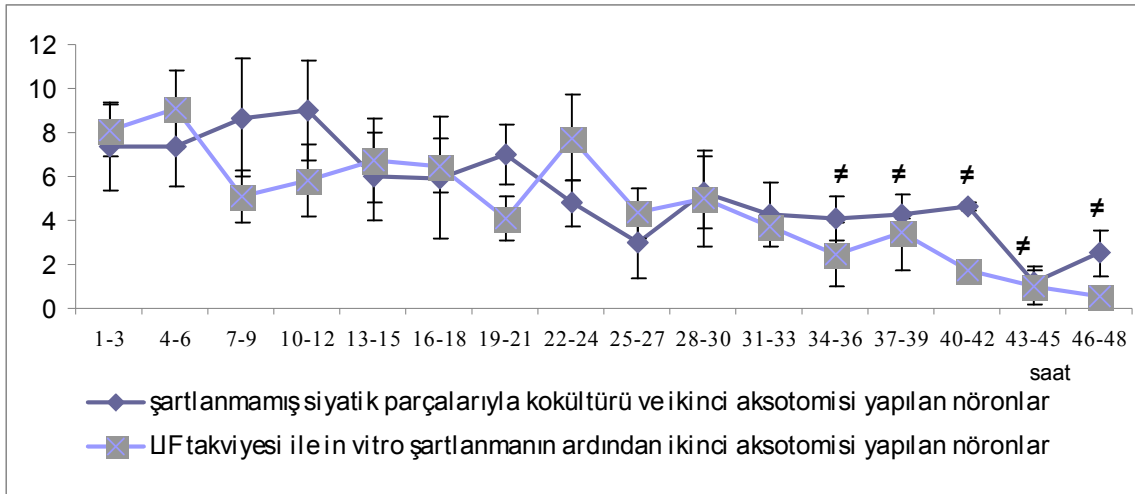


Şekil 4.107. Şartlı siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların ve in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların, rejenerasyona benzer hız ve aktiviteyle başladıkları, ancak ilk 24 saatte iki grubun rejenerasyon hız ve aktivitesinin birbirinin tersine bir rejenerasyon davranışı sergiledikleri gözlemlendi. İkinci 24 saatte ise rejenerasyon hız ve aktivitesinin birbirine benzer bir davranış sergilediği, ancak şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların hız ve aktivite açısından diğer gruba göre daha önde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.108, 4.109).

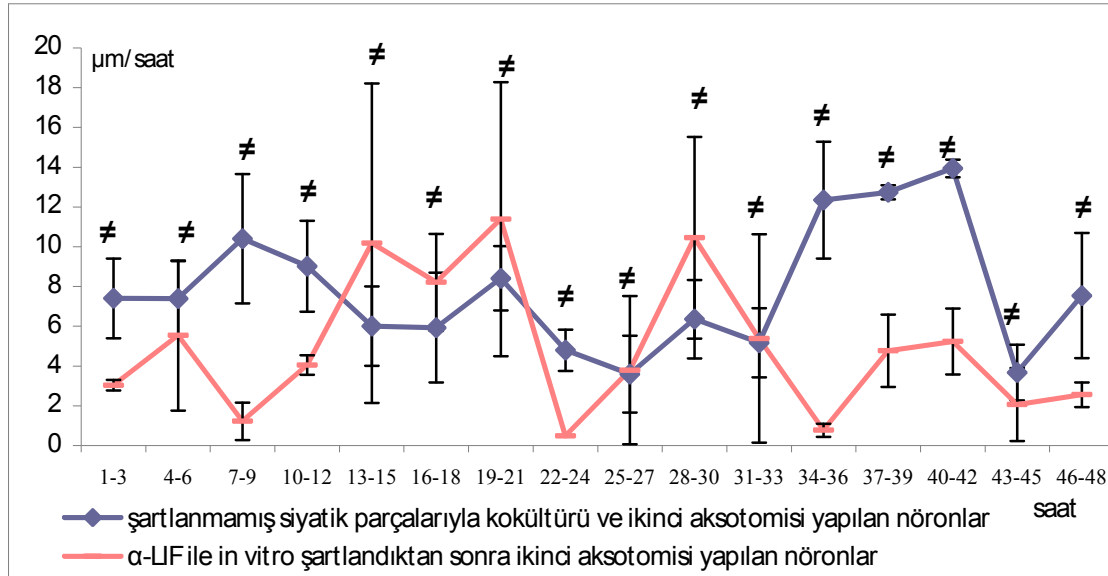


Şekil 4.108. Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

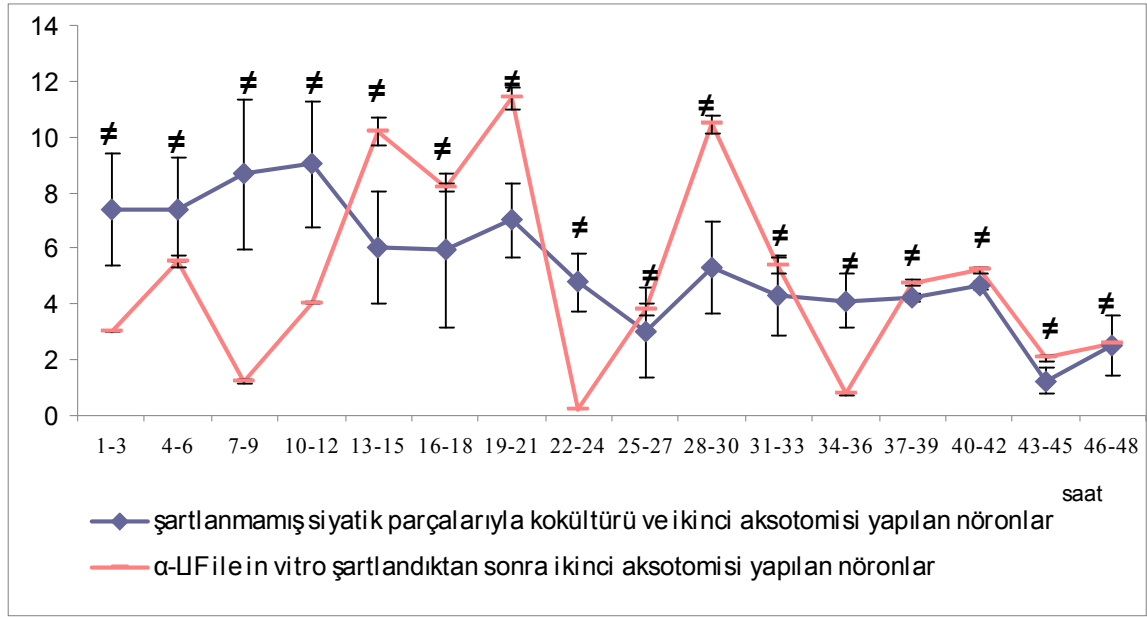


Şekil 4.109 Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla LIF takviyesi ile şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların ve anti-LIF ile muamele edildikten sonra aksotomisi yapılan nöronların, ilk 12 saatte hız ve aktivitelerinin birbirine zıt bir davranış sergiledikleri, 34. saatte kadar genel olarak birbirlerine benzer hız ve aktivitede rejenere oldukları gözlemlendi. 33 ile 36. saatler arasında ise anti-LIF ile muamele edildikten sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızının azalırken, şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların hızının arttığı daha sonra tekrar benzer bir hız tablosu çizdikleri, ancak 48. saatte şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla inkübe edilen ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların daha yüksek rejenerasyon hızına sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.110). 33 ile 36. saatler arasında şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitesi stabil iken; diğer grup nöronların aktivitesinin düştüğü, daha sonra her iki grubun rejenerasyon aktivitelerinin paralel olduğu gözlemlendi (Şekil 4.111).

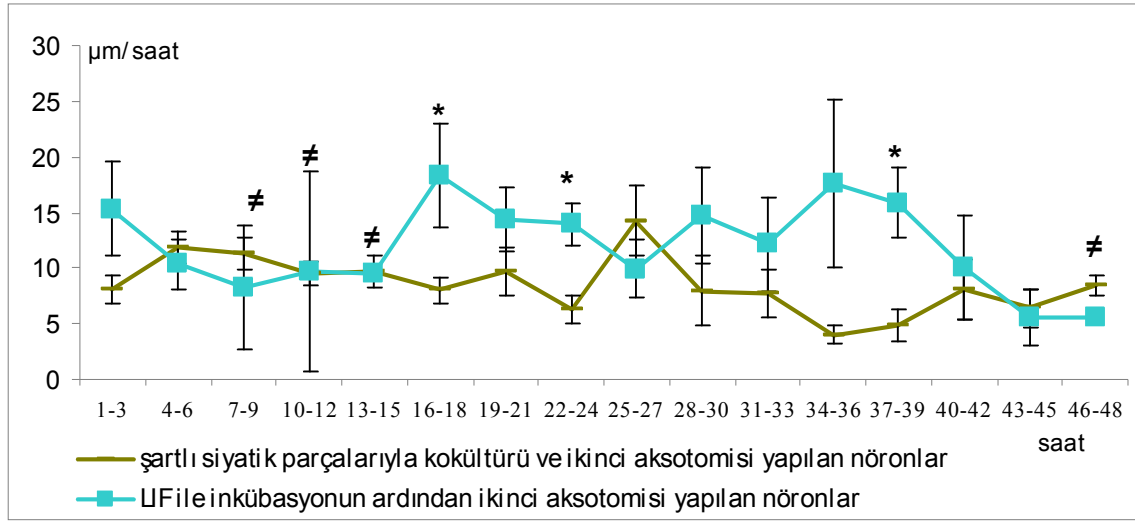


Şekil 4.110. Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

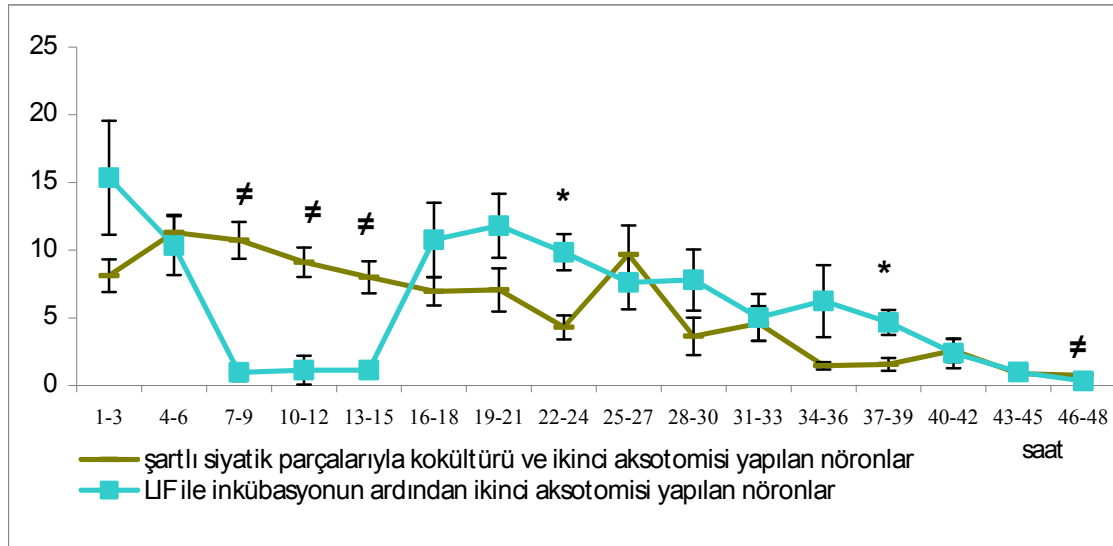


Şekil 4.111. Şartlanmamış siyatik parçaları ile kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlarla Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Genel olarak 48 saat boyunca şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların daha stabil bir hızla rejenere oldukları, buna karşın LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronların ise daha düzensiz bir tablo çizdikleri gözlemlendi (Şekil 4.112). İlk 15 saatte LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronların minimal rejenerasyon aktivitesi sergilemesine karşın; şartlanmış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların aktivitesinin daha stabil olduğu ve ikinci 24 saatte her iki grup nöronun da benzer bir rejenerasyon aktivitesi sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 4.113).

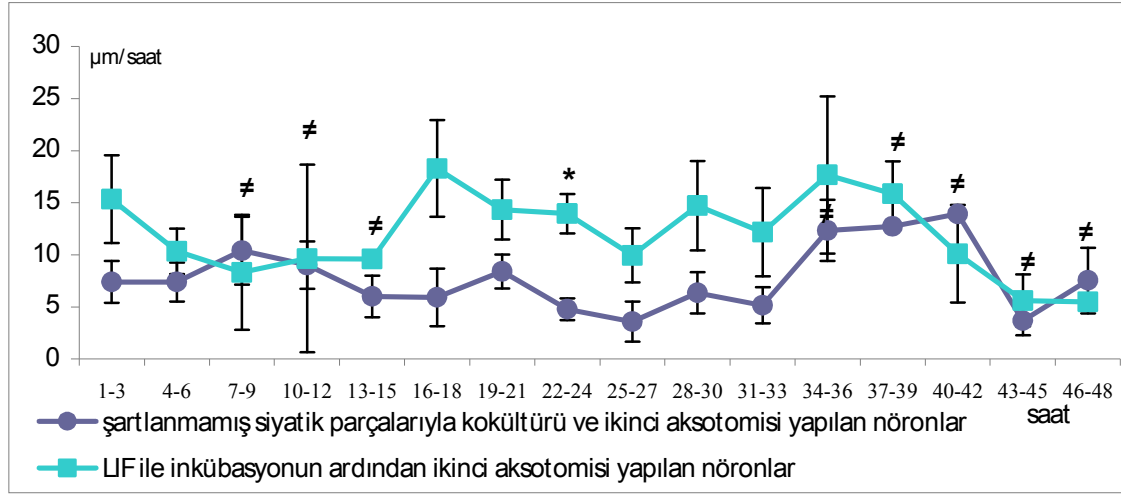


Şekil 4.112. LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

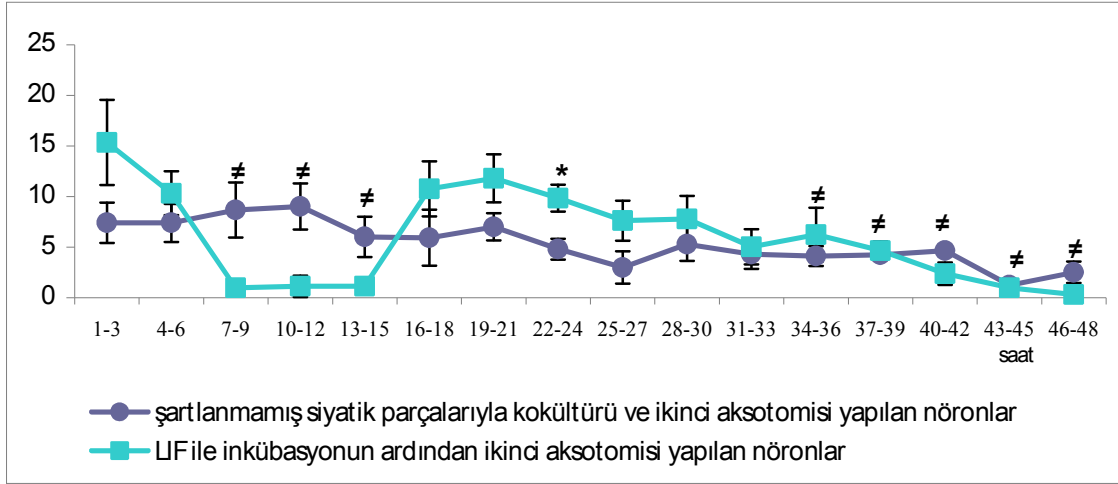


Şekil 4.113 LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların ve LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronların rejenerasyon hız ve aktivitesinin ilk 24 saatte birbirinin tersine artma ve azalma davranışı sergiledikleri, ikinci 24 saate gelindiğinde ise benzer bir hız ve aktivite ile rejenerasyona devam ettikleri gözlemlendi (Şekil 4.114, 4.115).

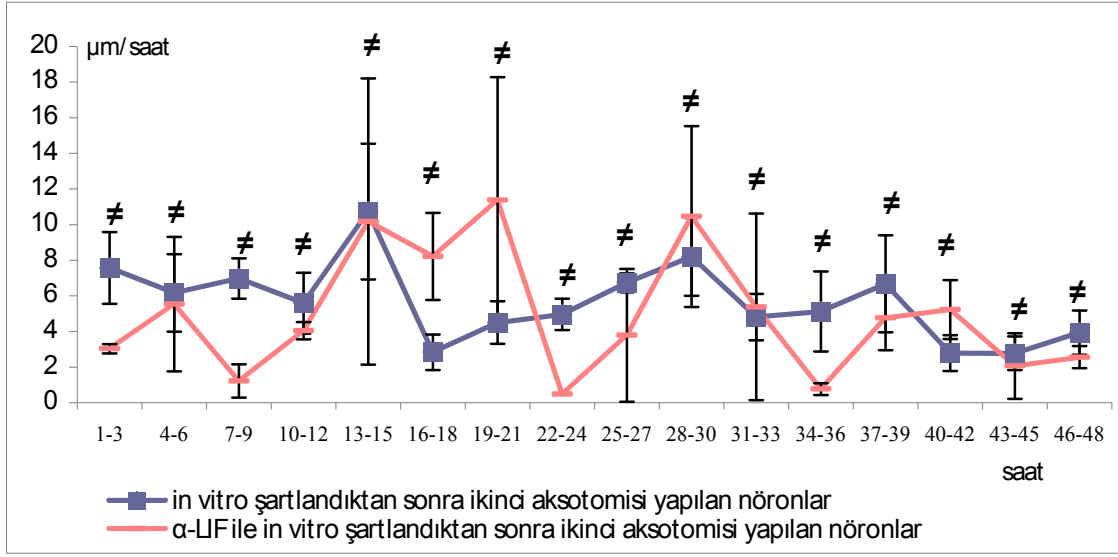


Şekil 4.114 LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

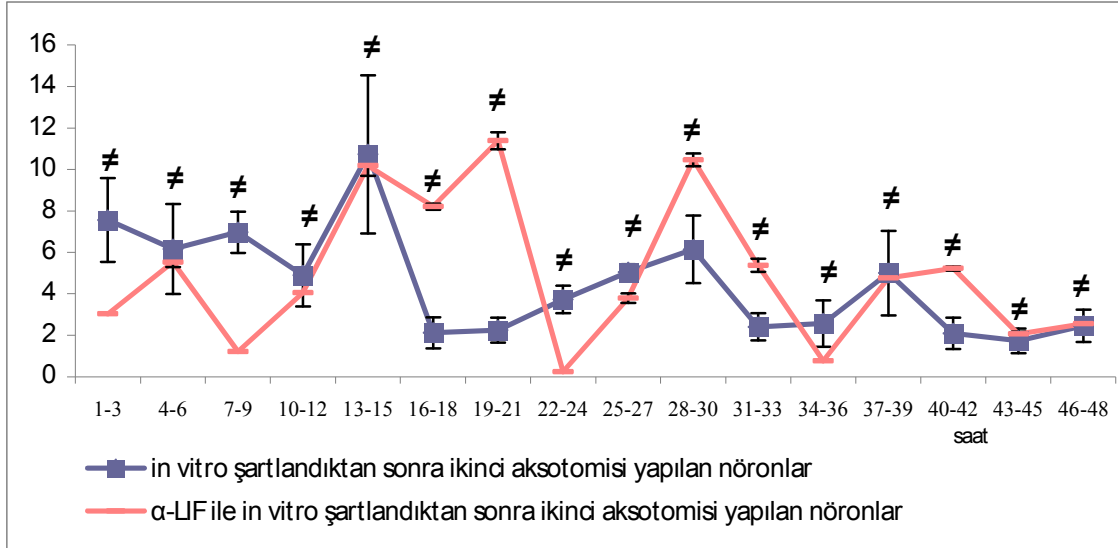


Şekil 4.115 LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar ile şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla anti-LIF ile muamele edildikten sonra aksotomisi yapılan nöronlar karşılaştırıldığında: ilk 12 saatte iki grubun hız ve aktivitelerinin birbirine zıt bir davranış sergiledikleri, daha sonra genel olarak her iki grubunda benzer hız ve aktivite ile rejenere oldukları, ancak anti-LIF ile muamele edildikten sonra aksotomisi yapılan nöronların hız ve aktivitelerinin diğer grup nöronlara oranla farklı iniş çıkışlı bir rejenerasyon davranışı sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 4.116, 4.117).

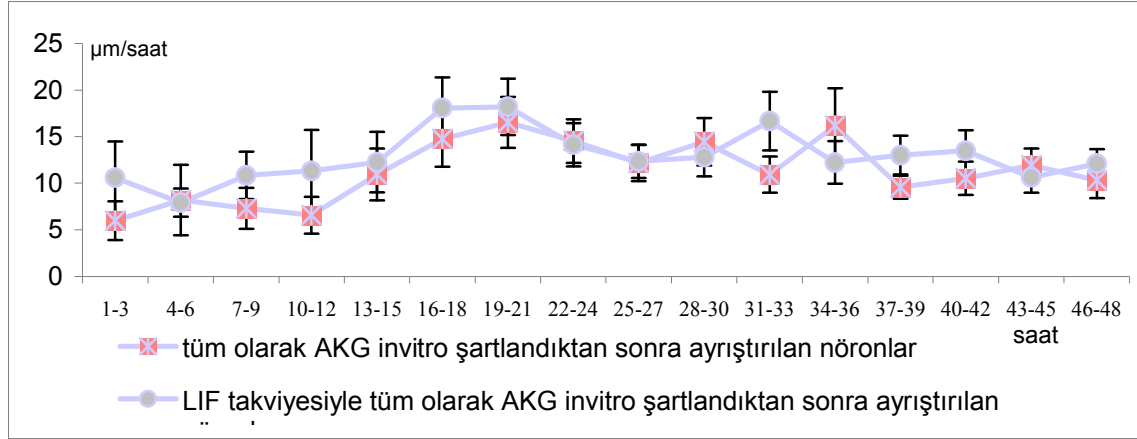


Şekil 4.116. İy vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlar ile anti LIF ile iy vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiğı (*: $p < 0.05$, ≠: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

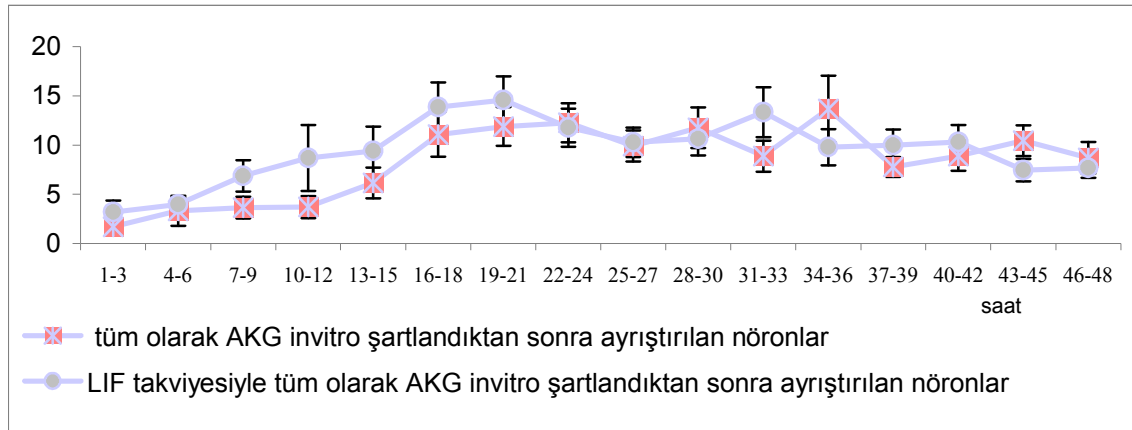


Şekil 4.117. İy vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlar ile anti LIF ile iy vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiğı (*: $p < 0.05$, ≠: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

Arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarıyla arka kök ganglionları LIF ile in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların genel olarak birbirine benzer hız ve aktivite ile rejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 4.118, 4.119)

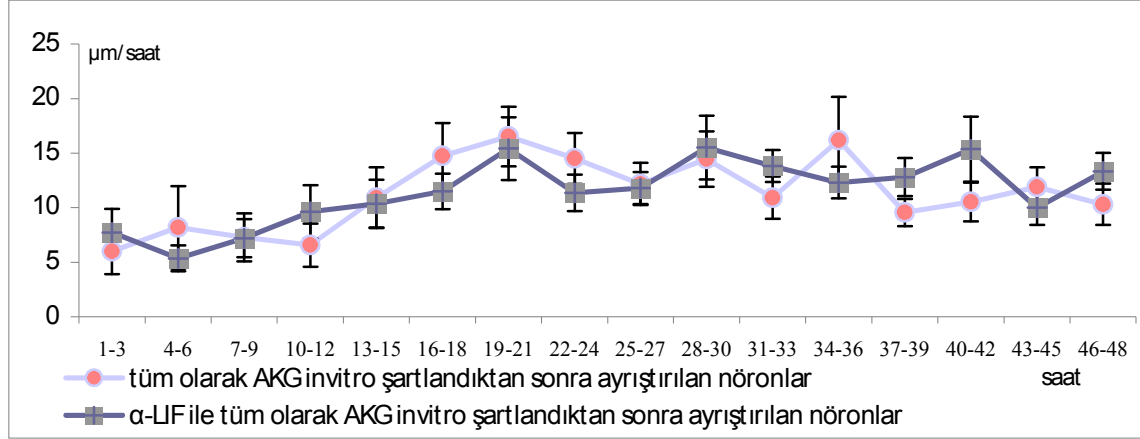


Şekil 4.118. Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile LIF takviyesiyle arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

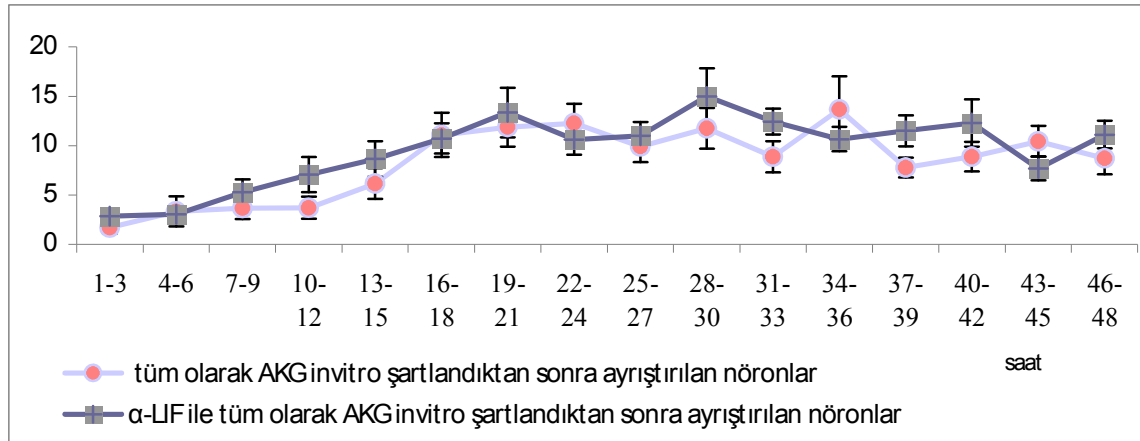


Şekil 4.119. Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile LIF takviyesiyle arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

Arka kök ganglionları in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlarıyla arka kök ganglionları anti-LIF ile in vitro ortamda bütün olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların genel olarak birbirine benzer hız ve aktivite ile rejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 4.120, 4.121).

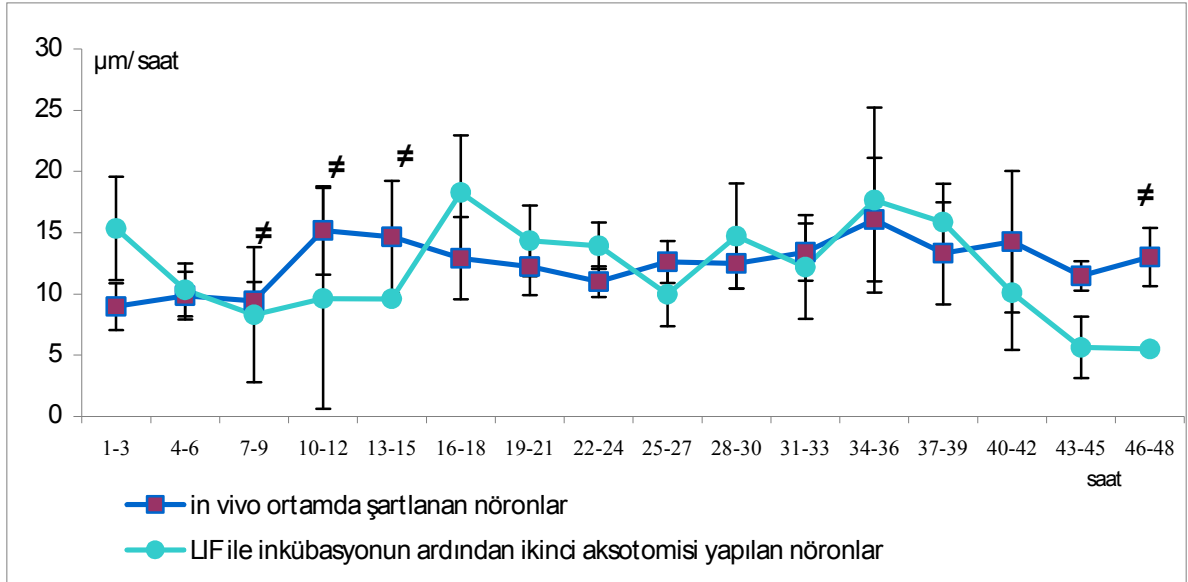


Şekil 4.120. Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile anti-LIF ile arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

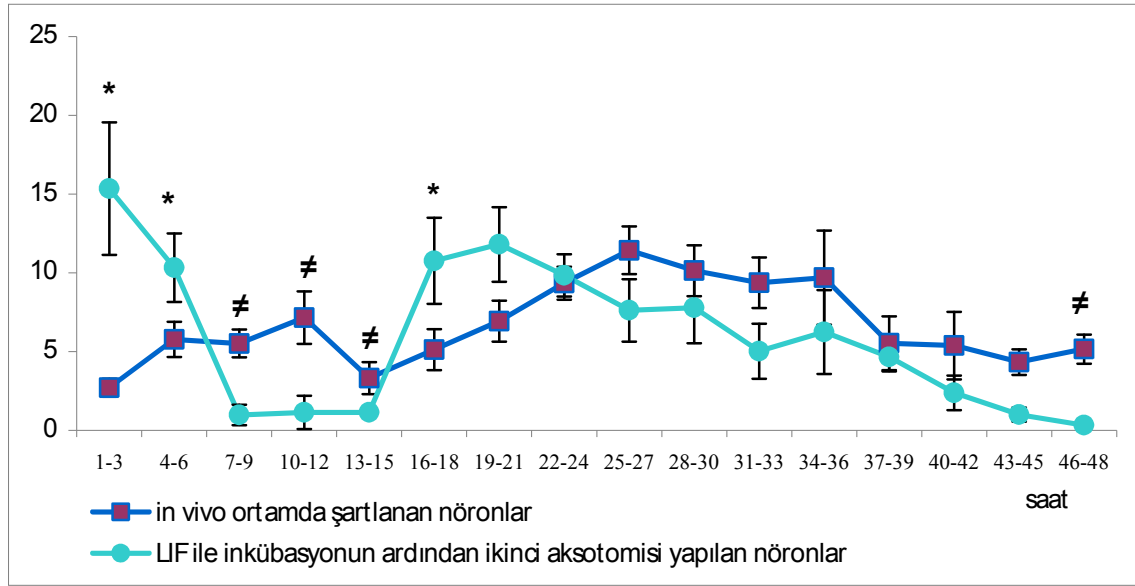


Şekil 4.121. Arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronları ile anti-LIF ile arka kök ganglionlarının bütün olarak in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$).

İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronlar karşılaştırıldığında: rejenerasyon hızlarının genel olarak benzer olduğu, ancak in vivo ortamda şartlanan nöronların LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronlara göre daha stabil bir hızla rejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 4.122). LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronların rejenerasyon aktivitesinin ilk 24 saat in vivo ortamda şartlanan nöronlara oranla düzensiz olarak arttığı, ikinci 24 saatte ise her iki grubun aktivitesinin benzer şekilde kademeli olarak azaldığı ve hem rejenerasyon hızında hem de rejenerasyon aktivitesindeki üstünlüğün in vivo ortamda şartlanan nöronlarda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.123).

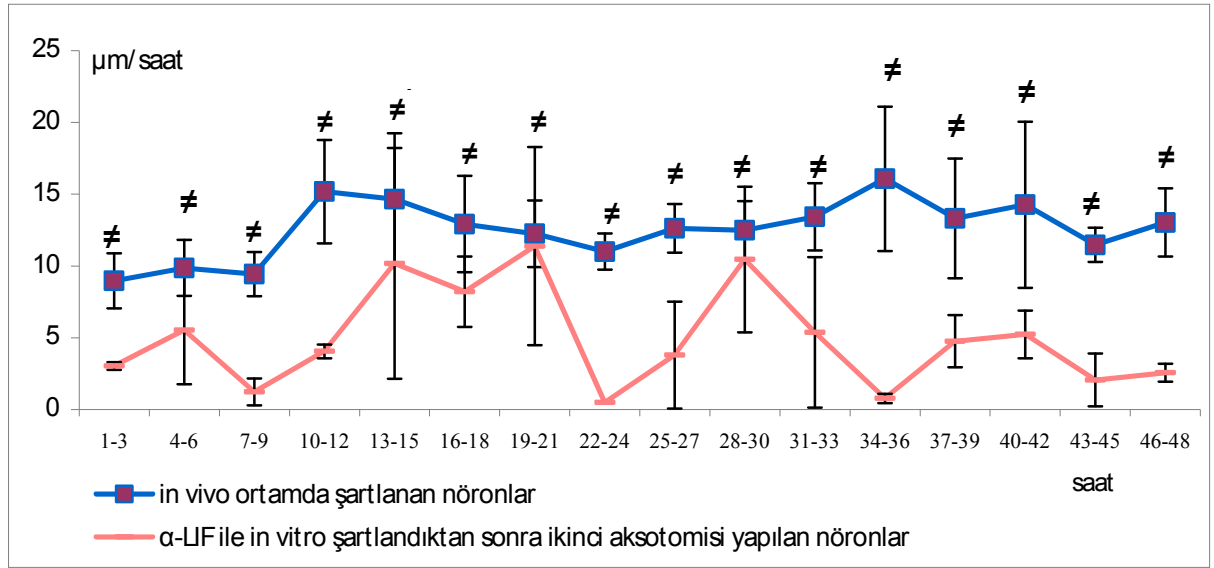


Şekil 4.122. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

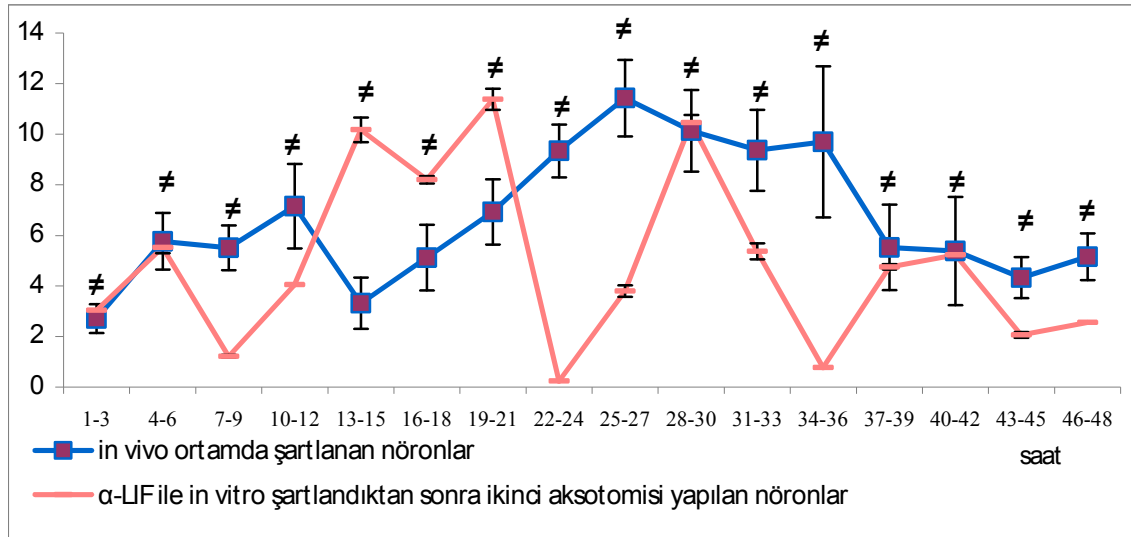


Şekil 4.123. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon hızının daha stabil iken diğer grup nöronların hızının çok değişken bir davranış sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.124). İlk 24 saatte in vivo ortamda şartlanan nöronların rejenerasyon aktivitesi kademeli olarak artarken; anti-LIF ile muamele edildikten sonra aksotomisi yapılan nöronların aktivitesinin düzensiz bir şekilde azaldığı gözlemlendi. İkinci 24 saatte ise her iki grubun rejenerasyon aktivitesinin azalma eğiliminde olduğu, 30. ve 42. saatlerde rejenerasyon aktivitelerinin eşit olduğu gözlemlendi (Şekil 4.125).

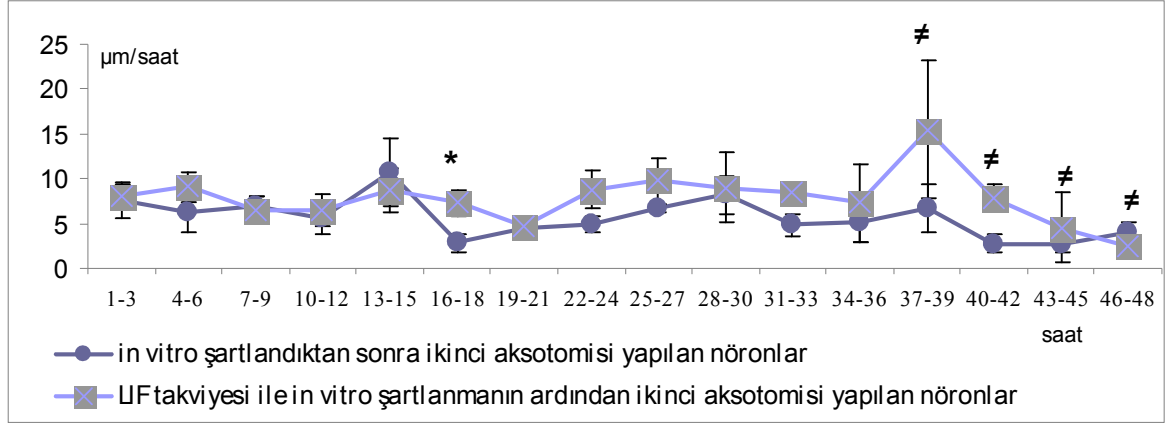


Şekil 4.124. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

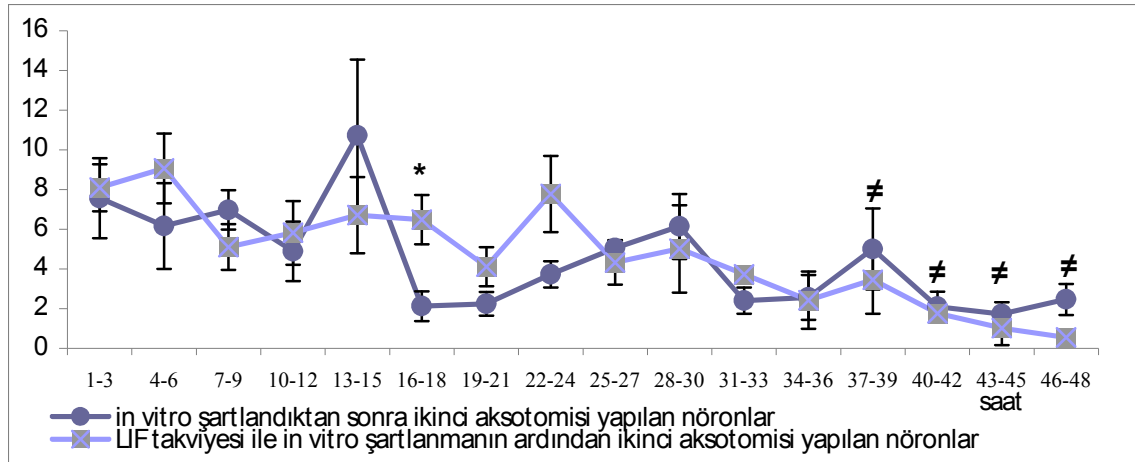


Şekil 4.125 İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vitro ortamda şartlandıktan sonra aksotomisi yapılan nöronlarla LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronlar karşılaştırıldığında rejenerasyon hız ve aktivitelerinin genel olarak benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.126.,4.127).

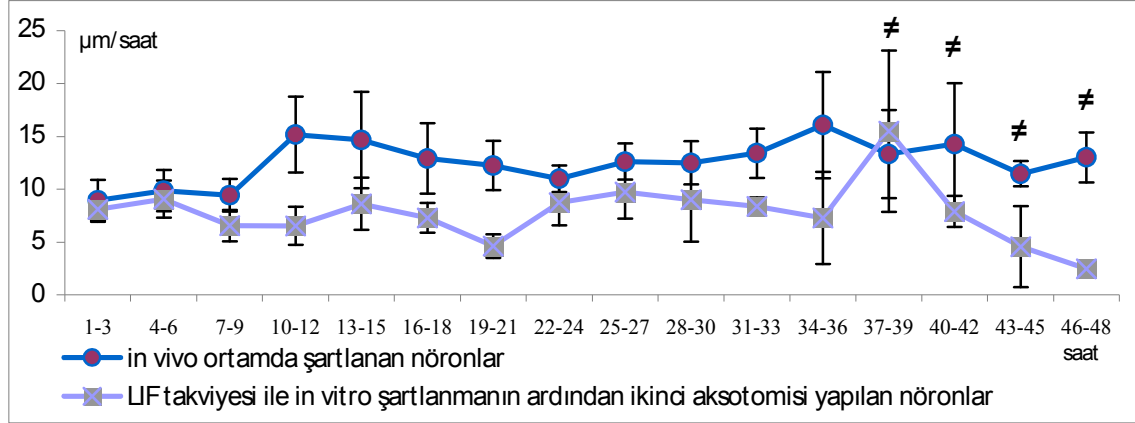


Şekil 4.126. İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon hızlarının karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

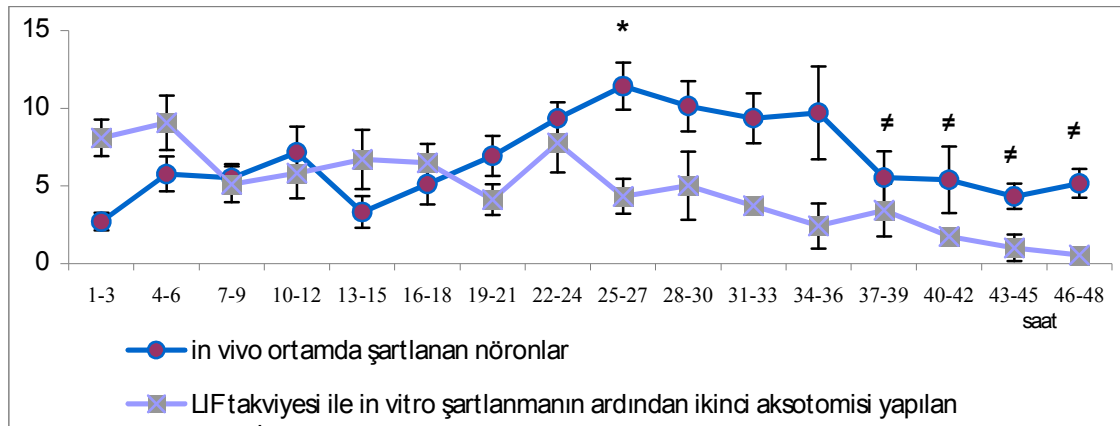


Şekil 4.127. İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p<0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF ile inkübe edildikten sonra aksotomisi yapılan şartsız nöronlar karşılaştırıldığında: rejenerasyon hız ve aktivitelerinin genel olarak benzer olduğu, ancak gerek rejenerasyon hızı gerekse rejenerasyon aktivitesindeki üstünlüğün in vivo ortamda şartlanan nöronlarda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.128., 4.129).

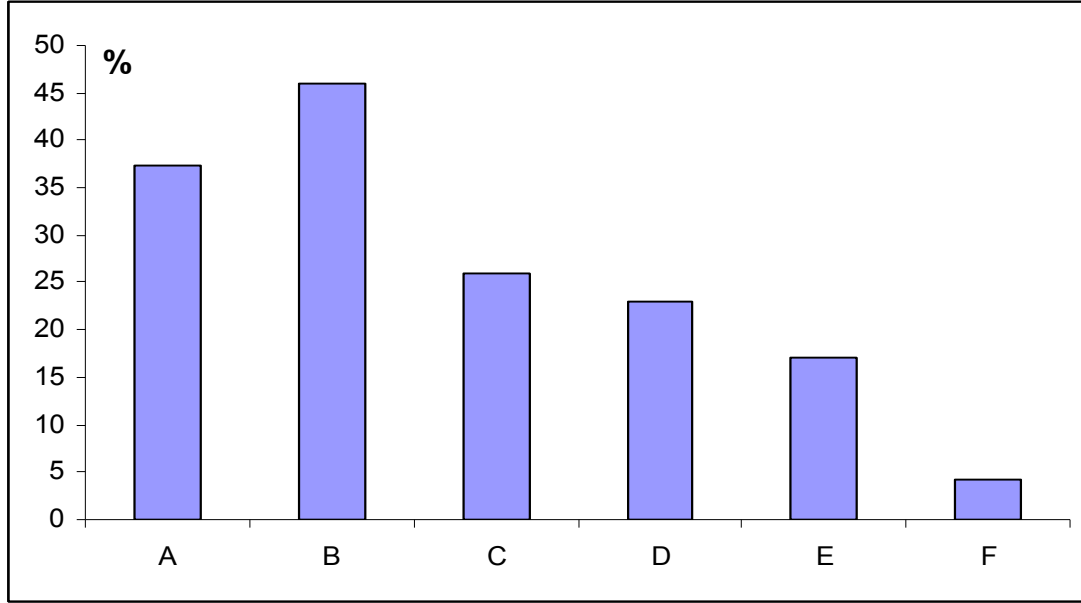


Şekil 4.128. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).



Şekil 4.129. İn vivo ortamda şartlanan nöronlarla LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronların rejenerasyon aktivitelerinin karşılaştırmalı grafiği (*: $p < 0.05$, #: veri sayısı az olduğundan iki grup arasında karşılaştırma yapılamamıştır).

İkinci aksotomisi laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile yapılan deney gruplarında rejenere olan toplam nöron sayısının yeterince yüksek olmaması nedeniyle bu gruplar arasında ilave istatistiksel analizler yapıldı. Bunun için aksotomi sonrası rejenerasyon gösteren nöron oranları kikare testiyle karşılaştırıldı.



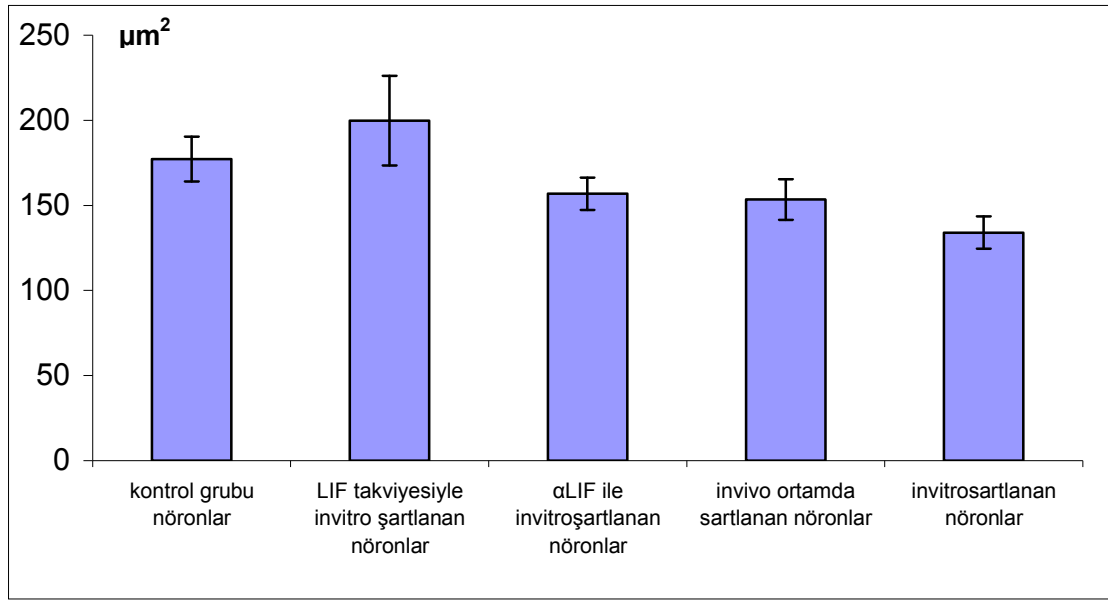
Şekil 4.130. İkinci aksotomisi laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile yapılan deney gruplarında aksotomi sonrası rejenerasyon gösteren nöron oranları. A. Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar, B. LIF ile inkübasyonun ardından ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar, C. LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronlar, D. İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlar, E. Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar, F. Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlar.

Çizelge 4.1. İkinci aksotomisi laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile yapılan deney gruplarında rejenerasyon gösteren nöronların istatistiksel olarak karşılaştırılması (Şekil 4.130'a ait P değerleri tablosu).

P	LIFle inkübasyondan sonra ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar	LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronlar	İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlar	Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar	Anti-LIF ile in vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlar
Şartlı siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar	0.401	0.215	0.147	0.39	0.0001
LIFle inkübasyondan sonra ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar		0.62	0.040	0.009	0.0001
LIF takviyesiyle in vitro ortamda şartlanmanın ardından ikinci aksotomisi yapılan nöronlar			0.832	0.17	0.005
İn vitro şartlandıktan sonra ikinci aksotomisi yapılan nöronlar				0.550	0.010
Şartlanmamış siyatik sinir parçalarıyla kokültürü ve ikinci aksotomisi yapılan şartlanmamış nöronlar					0.048

4.3. Bazı Deney Gruplarının Alan, Akson Çapı ve Dal Sayısının Analizi

Bazı deney gruplarındaki nöronların alan büyüklükleri karşılaştırıldı (Şekil 4.134). Kontrol grubu nöronların alanları ile karşılaştırdığımızda en küçük alan sahip olan nöronların in vitro ortamda şartlanan nöronlar olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronların en büyük alana sahip nöron grubu olduğu gözlemlendi. İn vitro şartlanma sırasında LIF takviyesinin nöron alanlarının artmasına neden olduğu belirlendi (Şekil 4.131).

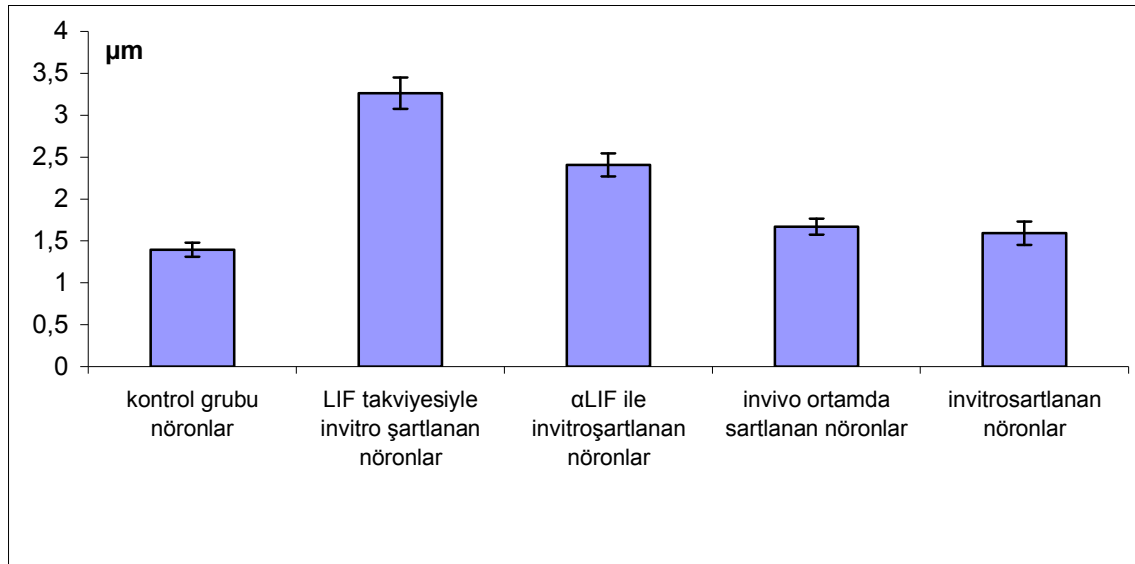


Şekil 4.131. Bazı deney gruplarındaki nöronların alan büyüklüğü grafiği.

Çizelge 4.2. Nöron alan büyüklükleri karşılaştırılan deney grupları (Şekil 4.131'e ait P değerleri tablosu).

P	İn vivo şartlandırma	İn vitro şartlandırma	LIF ile in vitro şartlandırma	Anti-LIF ile in vitro şartlandırma
Kontrol	0.203	0.043	0.283	0.321
İn vivo şartlandırma		0.357	0.027	0.869
İn vitro şartlandırma			0.005	0.317
LIF ile in vitro şartlandırma				0.058

Bazı deney gruplarındaki nöronların akson çapı büyüklükleri karşılaştırıldı (Şekil 4.134). En küçük akson çapına sahip nöronların kontrol grubu nöronlar olduğu, bunun yanı sıra en büyük akson çapına sahip nöronların ise in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi yapılan nöronlar olduğu gözlemlendi. İn vitro ve in vivo ortamda şartlanan nöronlar ile kontrol grubu nöronların akson çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmaması şartlanmanın tek başına akson çapını arttırıcı bir etkisinin olmadığını gösterdi. Ancak in vitro şartlanma sırasında gerek LIF takviyesinin gerekse Anti-LIF uygulamasının hem şartlanan hem de şartlanmayan nöronlara oranla akson çapını arttırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.132).

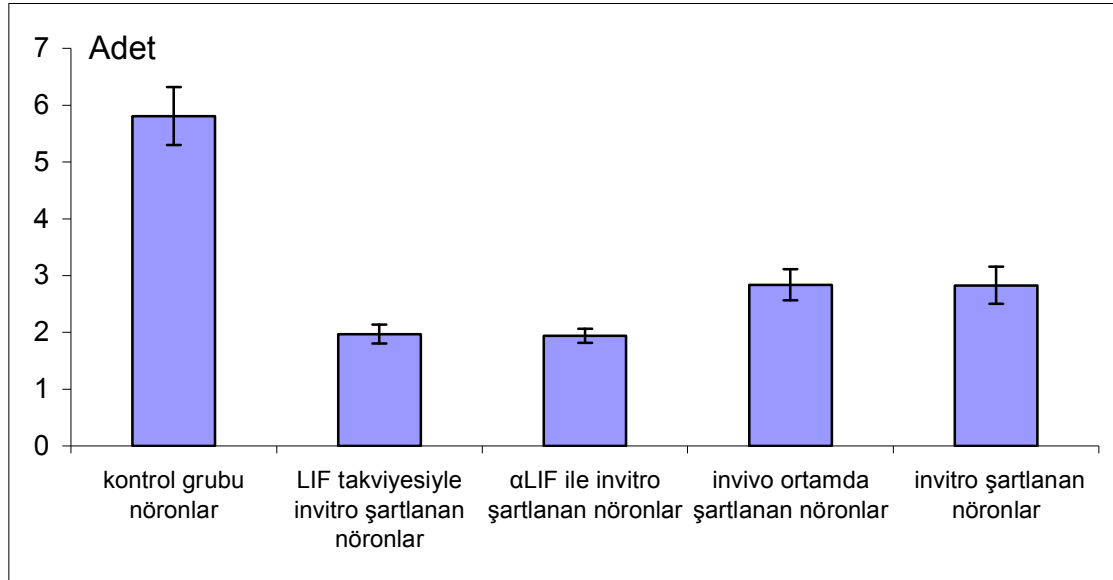


Şekil 4.132. Bazı deney gruplarındaki nöronların akson çapı büyüklüğü grafiği.

Çizelge 4.3. Akson çapları karşılaştırılan deney grupları (Şekil 4.132'ye ait P değerleri tablosu).

P	İn vivo şartlandırma	İn vitro şartlandırma	LIF ile in vitro şartlandırma	α-LIF ile in vitro şartlandırma
Kontrol	0.076	0.263	0.0001	0.0001
İn vivo şartlandırma	-	0.661	0.0001	0.0001
İn vitro şartlandırma		-	0.0001	0.0001
LIF ile in vitro şartlandırma			-	0.0001

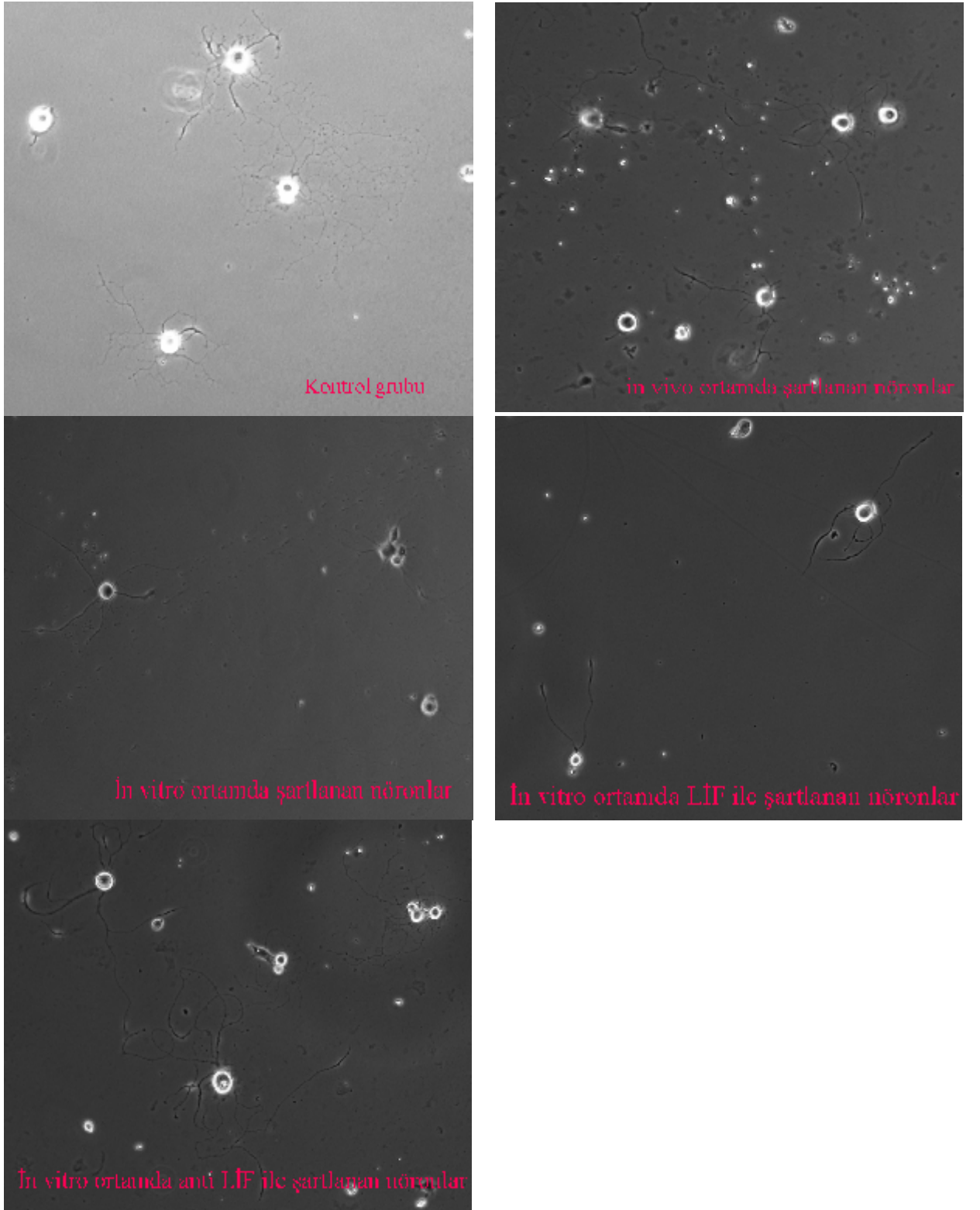
Bazı deney gruplarındaki nöronların dal sayıları kıyaslandı (Şekil 4.134). Kontrol grubu nöronların en fazla akson dalı sayısına sahip oldukları gözlemlendi. Bunun yanı sıra in vitro şartlanma sırasında LIF takviyesi, Anti-LIF uygulaması yapılan, in vitro ve in vivo ortamlarda şartlanan nöronların dal sayısı bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı ancak kontrol grubu nöronların dal sayısının tüm diğer grup nöronların dal sayılarından istatistiksel olarak anlamlı farklılığının olduğu saptandı. Buna göre LIF takviyesinin, Anti-LIF uygulamasının ve şartlanmanın aksonların dal sayısını azaltıcı bir etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.133).



Şekil 4.133. Bazı deney gruplarındaki nöronların dal sayısı grafiği.

Çizelge 4.4. Dal sayısı karşılaştırılan deney grupları (Şekil 4.133'e ait P değerleri tablosu).

P	İn vivo şartlandırma	İn vitro şartlandırma	LIF ile in vitro şartlandırma	α -LIF ile in vitro şartlandırma
Kontrol	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
İn vivo şartlandırma	-	0.888	0.60	0.53
İn vitro şartlandırma		-	0.61	0.53
LIF ile in vitro şartlandırma			-	0.931



Şekil 4.134. Akson çapları, alanları ve dal sayıları karşılaştırılan deney grupları.

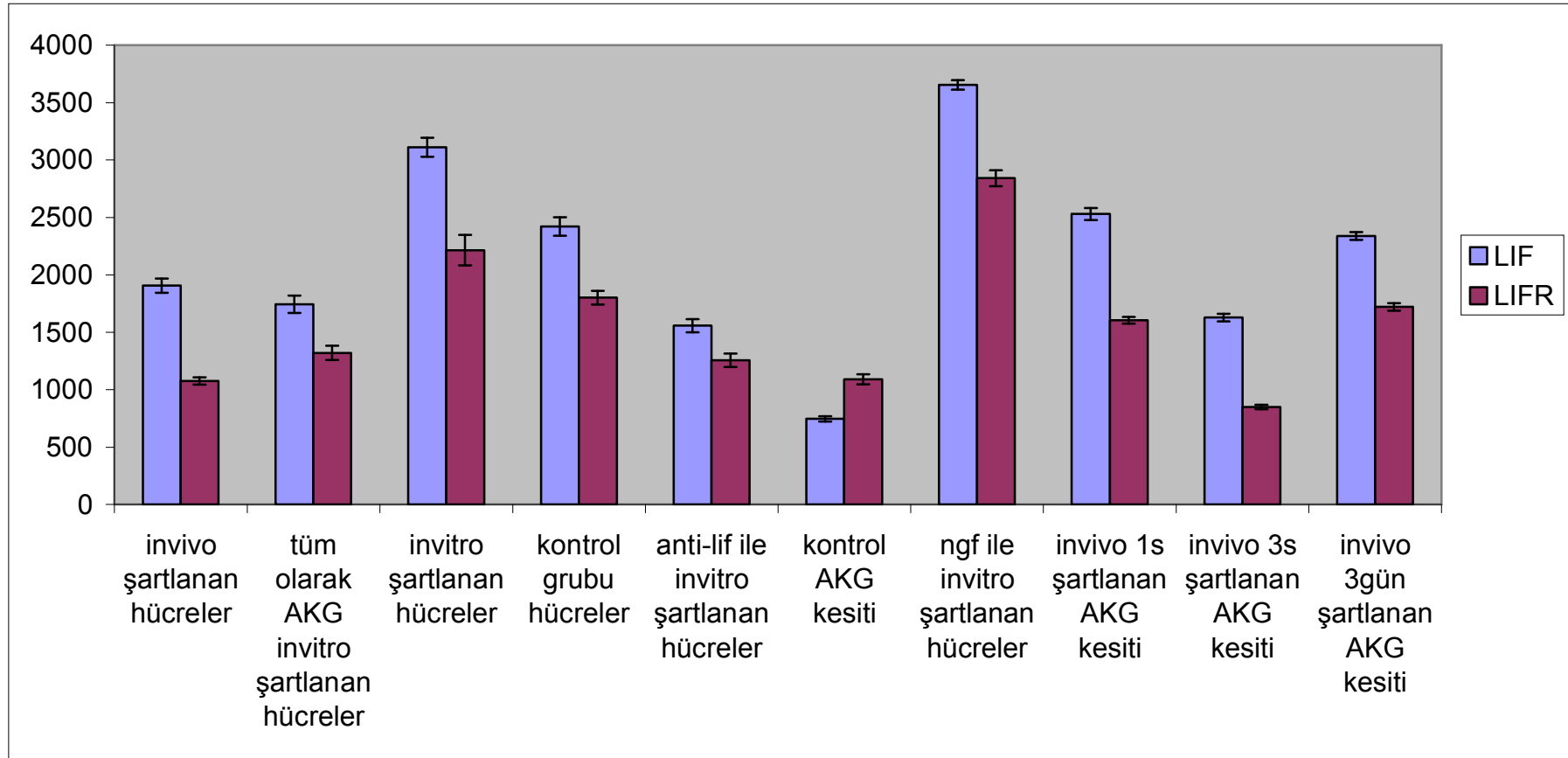
4.4. LIF ve LIF Reseptörünün İmmunohistokimyasal Analizi

LIF ve LIF reseptörünün immunohistokimyasal analizi sonucunda: en düşük LIF seviyesinin hiçbir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol arka kök ganglion kesitlerinde olduğu, ancak siyatik siniri hasarlandıktan bir saat sonra çıkartılarak kesiti alınan arka kök ganglionunda hem LIF hem de LIF reseptör miktarının arttığı gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubu arka kök ganglionu kesitlerinde, gerek hücre kültürü yapılarak gerekse kesitleri alınarak immunohistokimyasal analizleri yapılan deney gruplarından farklı olarak LIF reseptörünün LIF'ten daha fazla olduğu saptandı. Yine kontrol grubu AKG kesitlerine oranla siyatik siniri kesildikten 3 saat ve 3 gün sonra çıkartılarak kesitleri alınan arka kök ganglionlarında LIF ve LIF reseptörünün daha fazla olduğu saptandı. Nöronlarına ayrıştırıldıktan sonra immunohistokimyasal analizleri yapılan deney gruplarından herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu nöronlarda tespit edilen LIF ve LIF reseptörünün kontrol grubu AKG kesitlerine göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra kontrol grubu nöronların, in vivo ortamda şartlanan nöronlara, tüm olarak AKG in vitro şartlandıktan sonra ayrıştırılan nöronlara ve anti-LIF muamelesiyle in vitro şartlanan nöronlara oranla daha yüksek miktarda LIF ve LIF reseptörü içerdikleri saptandı. İn vitro şartlanan nöronlar ile kültür aşaması ve in vitro şartlanma sırasında NGF ile muamele edilen nöronların LIF ve LIF reseptör yoğunluğunun kontrol grubu nöronlara nazaran daha fazla olduğu ve en yüksek seviyede LIF ve LIF reseptörü içeren deney gurubunun yine NGF ile muamele edilen in vitro şartlı nöronlar olduğu belirlendi (Şekil 4.135).

En yüksek LIF ve LIF reseptör yoğunluğunun kültür aşaması ve in vitro şartlanma sırasında NGF ile muamele edilen nöronlarda saptanması nedeniyle LIF ve LIF reseptörü immunohistokimyasal anlizi yapılan tüm deney gruplarının deney gruplarının nöron alanları ile LIF ve LIF reseptör korelasyon analizleri yapıldı. Sonuç olarak; in vivo ortamda şartlanan nöronların LIF reseptörleriyle alanları arasında korelasyon olduğu, in vitro ortamda NGF ile şartlanan nöronlarla LIF arasında korelasyon olduğu, in vivo ortamda siyatik siniri bir saat şartlanan nöronların hem LIF hem de LIF reseptörleri ile alanları arasında bir korelasyon olduğu tespit edildi.

İmmunohistokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilen verilerle LIF ve LIF reseptörlerinin farklı deney gruplarındaki yoğunlukları karşılaştırıldı. Buna göre; deney

grupları arasındaki LIF ve LIF reseptörünün yoğunlukları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların saptandığı çizelgeler aşağıda bulunmaktadır (P değeri 0.05'ten küçük olan veriler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir).



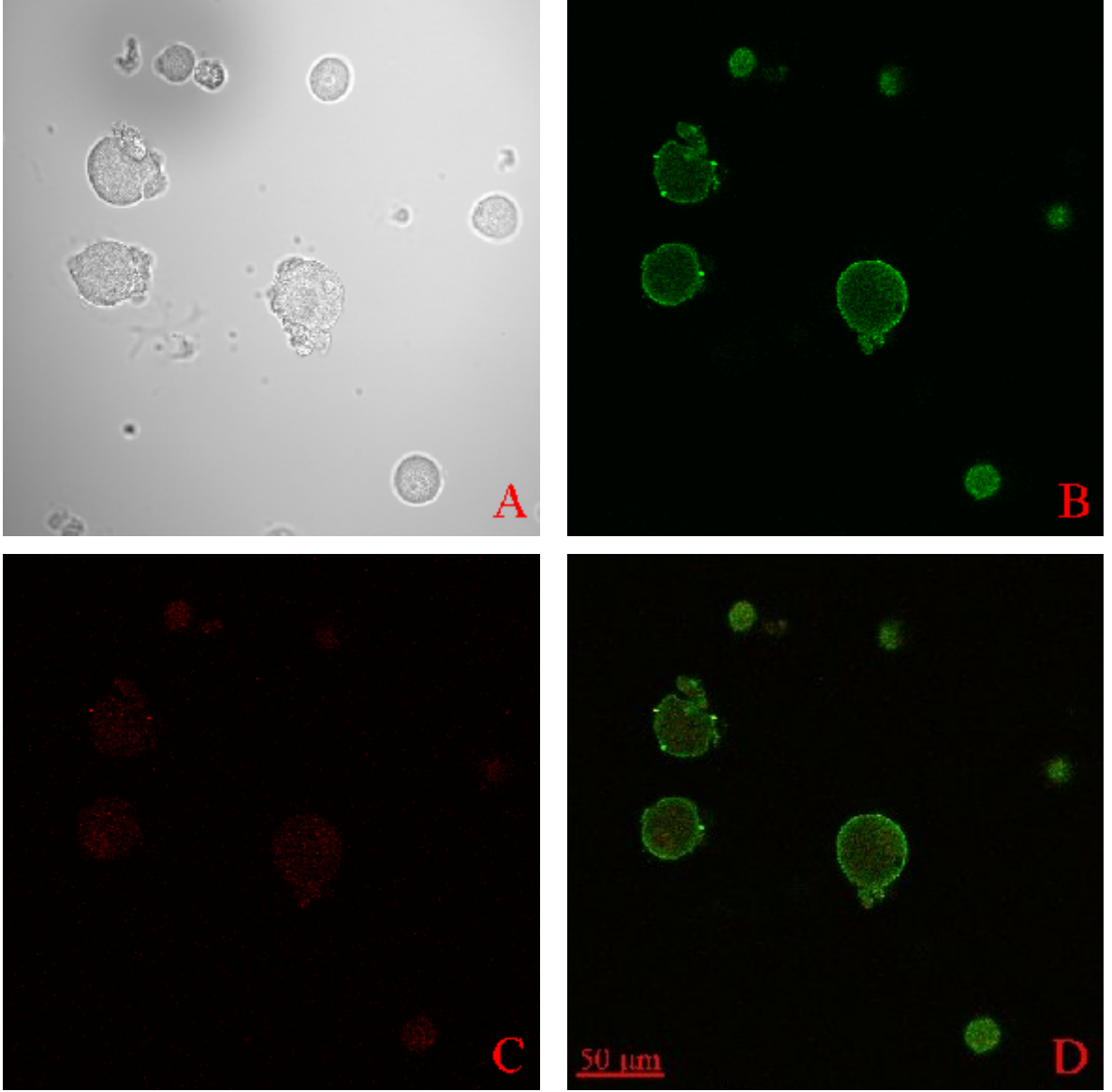
Şekil 4.135. İmmunohistokimyasal LIF ve LIF reseptör analizleri yapılan deney grupları.

Çizelge 4.5. İmmünohistokimyası yapılan deney gruplarında LIF reseptörlerinin çoklu karşılaştırılması (ANOVA-LSD).

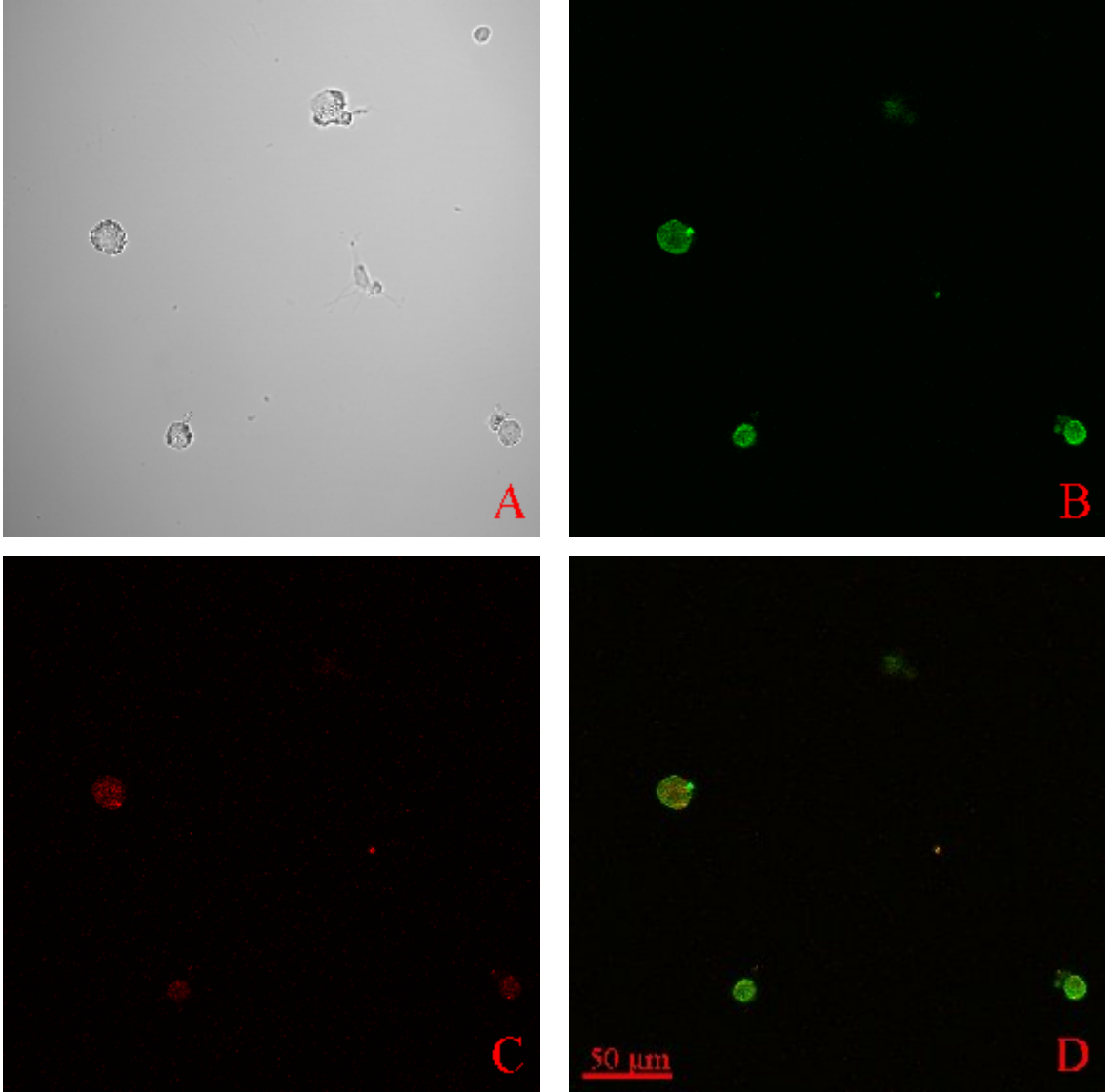
[illegible]

Çizelge 4.6. İmmünohistokimyası yapılan deney gruplarında LIF'in çoklu karşılaştırılması (ANOVA-LSD).

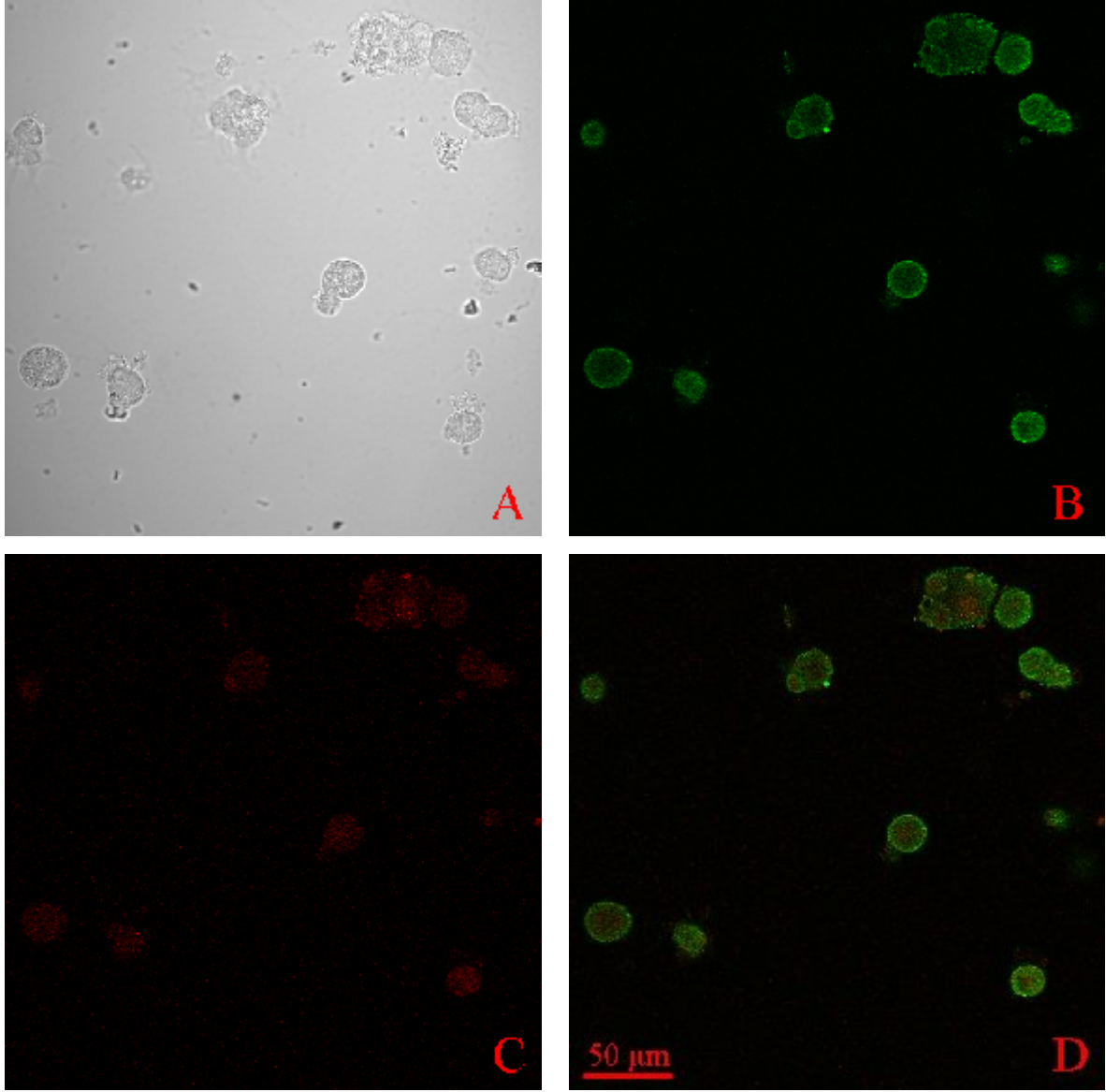
[illegible]



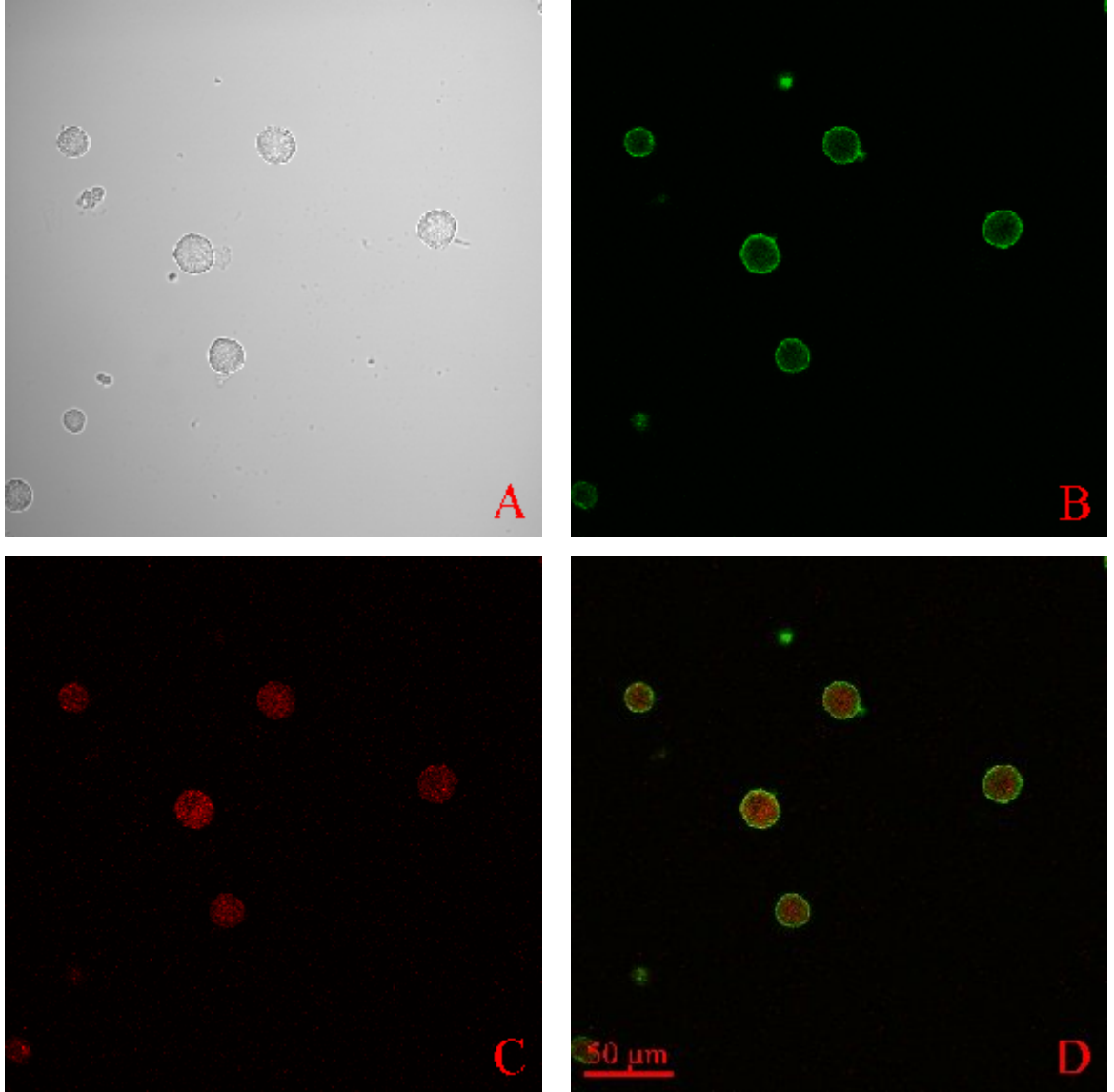
Şekil 4.136. İn vivo ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



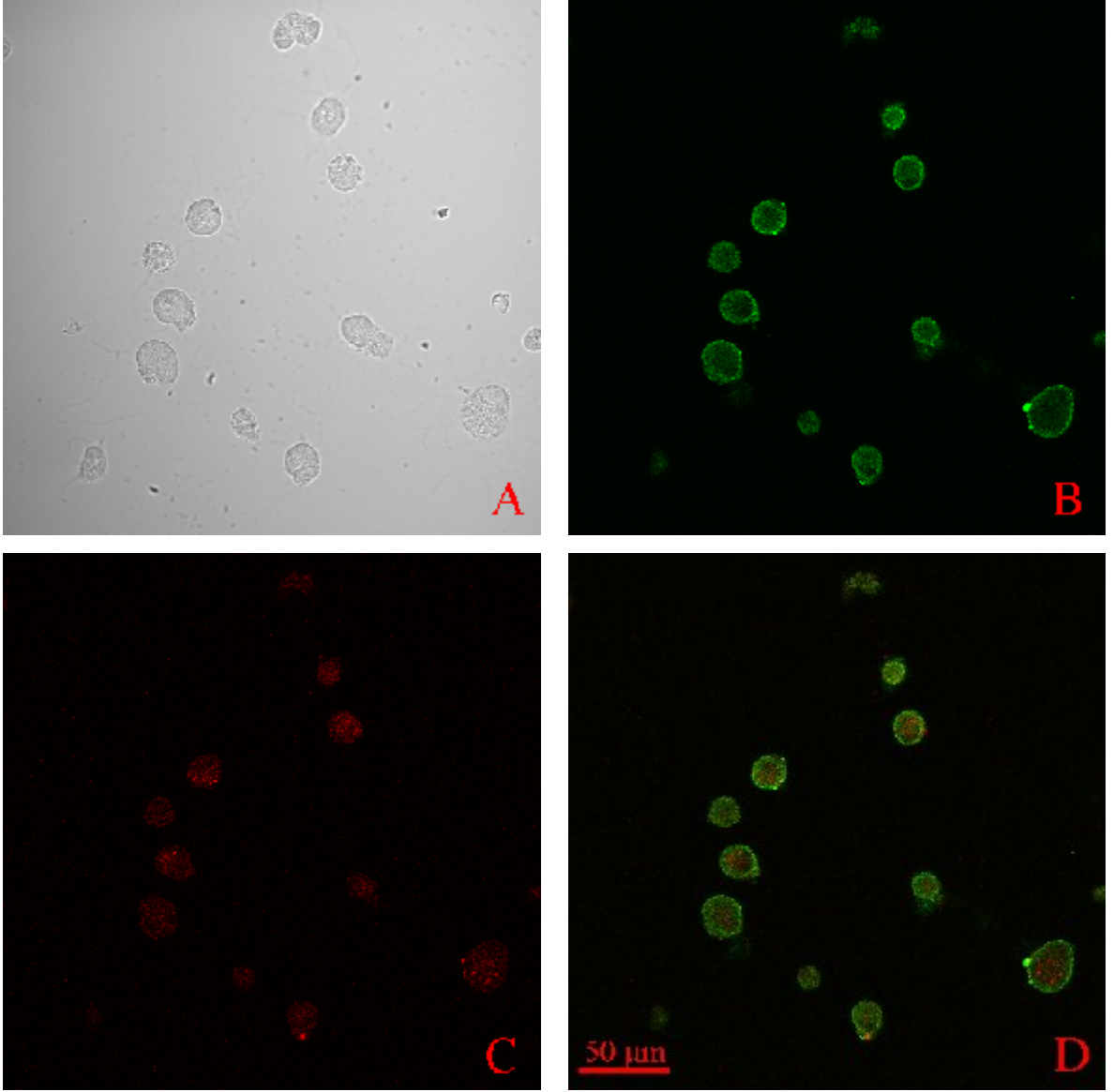
Şekil 4.137. İn vitro ortamda tüm olarak şartlandıktan sonra ayrıştırılan arka kök ganglion nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



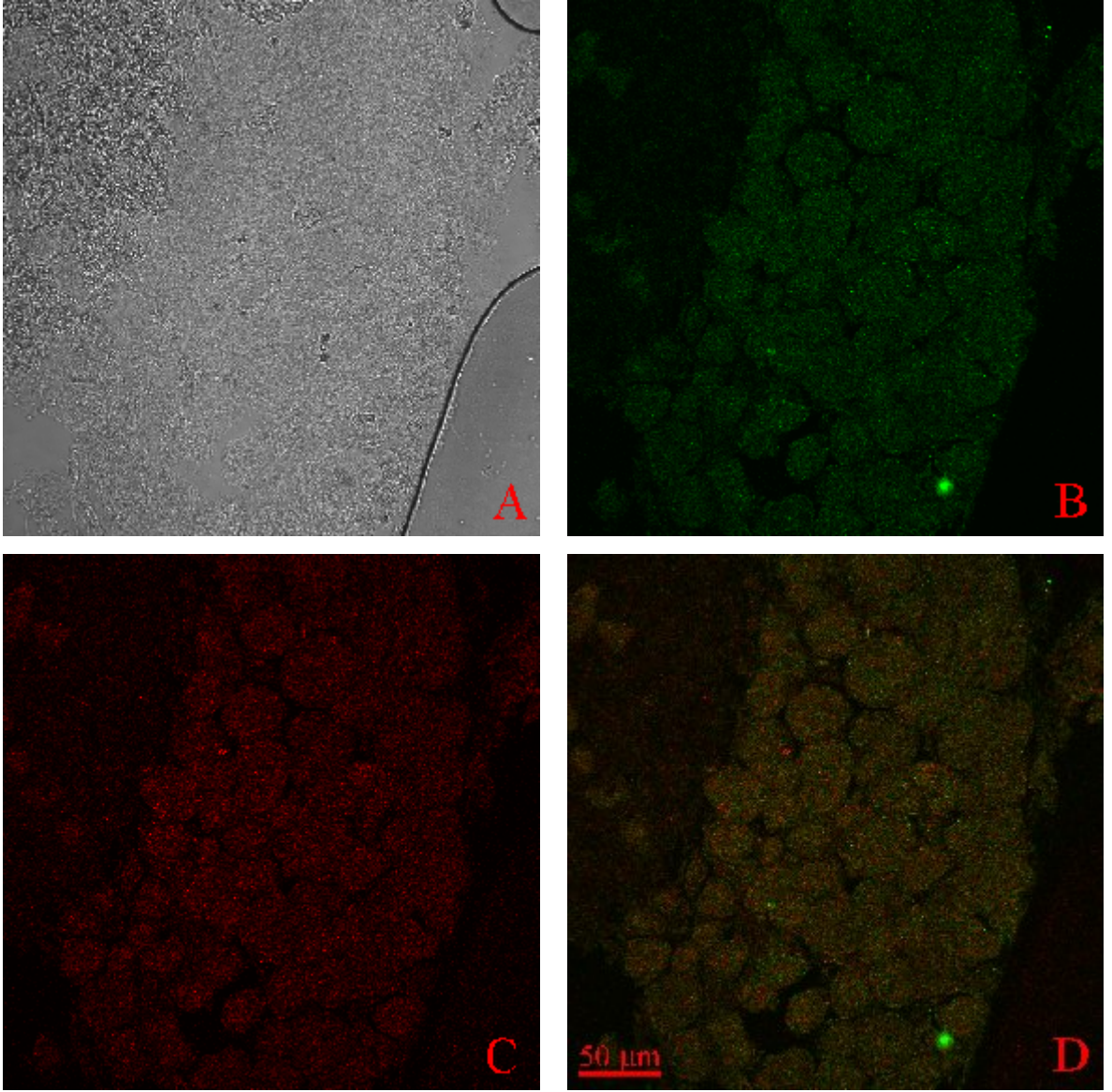
Şekil 4.138. İn vitro ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



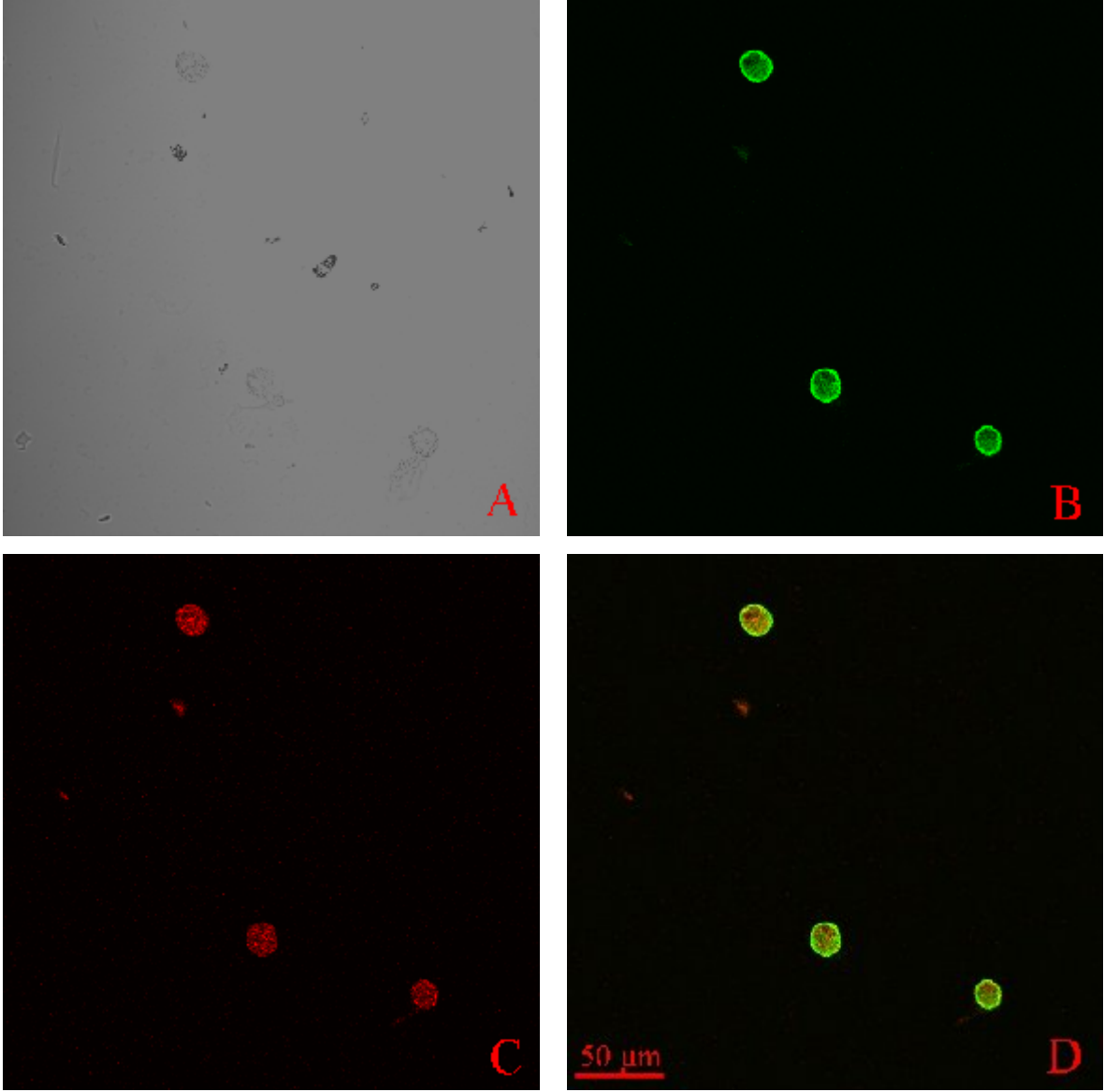
Şekil 4.139. Herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



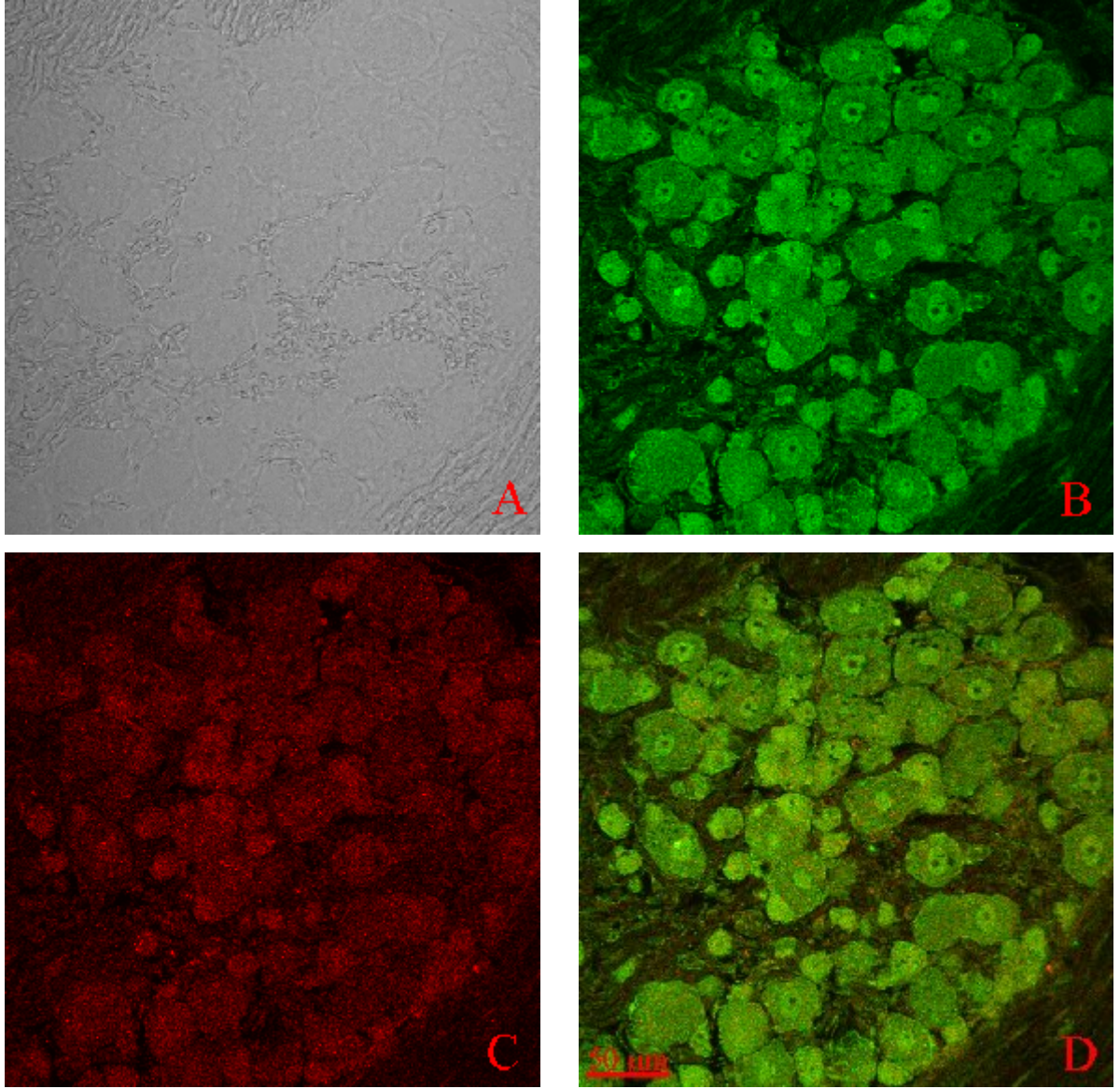
Şekil 4.140. Anti-LIF ile in vitro ortamda şartlanan nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



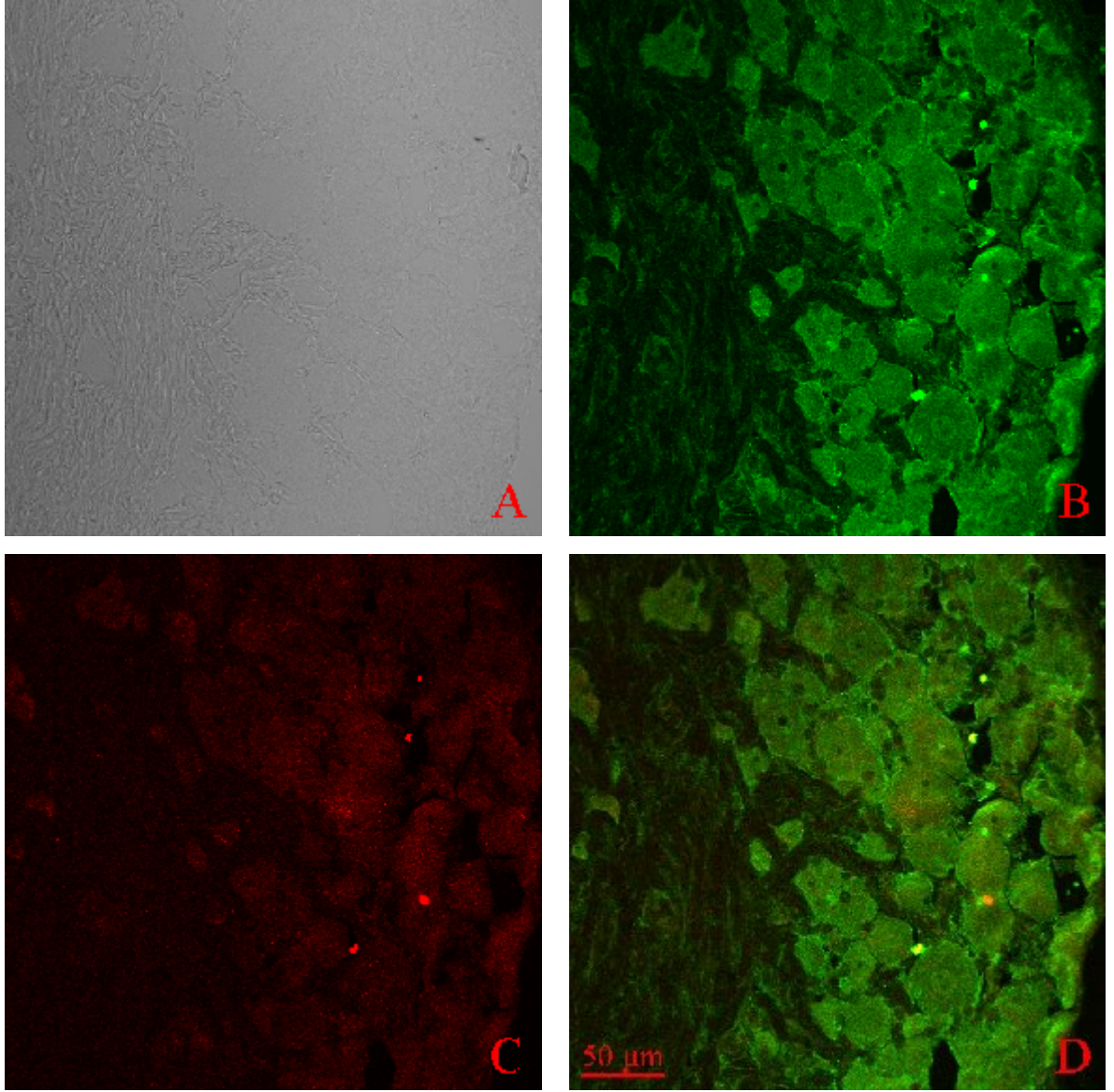
Şekil 4.141. Herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu arka kök ganglion kesiti nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



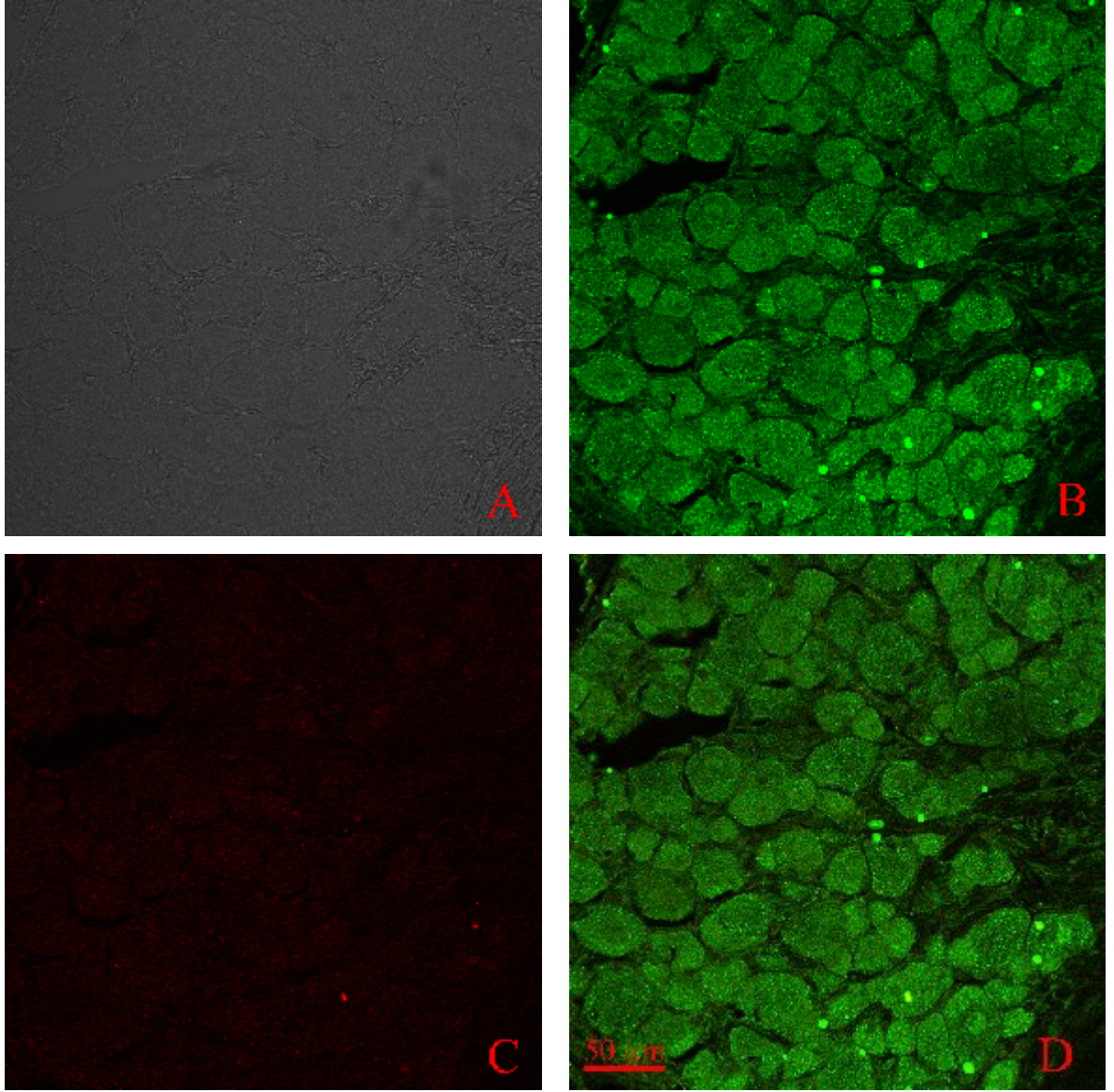
Şekil 4.142. LIF ile NGF arasındaki karşılıklı ilişkinin araştırıldığı nöronların transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



Şekil 4.143. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek bir saat şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



Şekil 4.144. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek üç saat şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.



Şekil 4.145. İn vivo ortamda siyatik siniri kesilerek üç gün şartlanan arka kök ganglion kesitinin transmisyon (A), LIF (B), LIF reseptörü (C), LIF+LIF reseptörü (D) görüntüleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tez Çalışmasında Geliştirilen ve Uygulanan Yeni Tekniklerin Etkinlikleri

5.1.1. In Vitro şartlandırma modeli

Periferik sinir sistemi, bir hasar ardından yüksek kapasiteli rejenerasyon yeteneğine sahip olup bu rejenerasyon kapasitesi, şartlandırma hasarı ile artırılabilir (McQuarrie ve ark., 1978; McQuarrie ve Garfstein, 1981). Şartlandırma hasarının rejenerasyonu arttırıcı bu etkisi ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle in vivo ortamda siyatik sinire uygulanan bir şartlandırma hasarının ardından in vitro olarak takibi söz konusudur. Siyatik sinir; kesme (Oblinger ve Lasek, 1984; Torigoe ve ark., 1999), ezme (Brushart ve ark., 1998) ve turnike ile basınç uygulama (Wiederberg ve ark., 2001) gibi farklı modeller kullanılarak hasarlanmıştır. Siyatik sinir liflerinin çoğunun sonlandığı L4 ve L5 arka kök ganglionlarında değişiklikler beklendiğinden dolayı çalışmalar, bu ganglionlara ait nöronlar üzerine temellendirilmiştir. Siyatik sinir kesisi ve bunu takiben bir süre sonra L4 ve L5 arka kök ganglionlarından kültür yapıldığında: çoğunlukla bu ganglionlardaki siyatik sinire lif vermeyen, dolayısıyla şartlanmamış nöronların da deneye dahil olması sonuçları etkileyebilecek teknik bir sorundur. Bu çalışmada şartlandırma hasarı çalışmalarının tamamı in vitro ortamda gerçekleştirildi ve tüm nöronlar şartlandırıldı. Bu yeni metotla hem hücrede meydana gelen değişiklikler takip edilebildi, hem de nöron dışı hücreler ve faktörlerin etkisi araştırılabilir. Böylece, in vitro ortama çeşitli faktörlerin ve inhibitörlerin eklenmesi ile müdahale edilerek deneyler yapıldı.

Primer hücre kültür işlemleri sırasında nöronlar enzimatik ve mekanik etkilerle aksonlarını kaybederler. Bu nedenle bu tez çalışmasında kültür işlemlerinin aynı zamanda aksotomi anlamına da geldiği öngörüldü ve deneyin niteliğine göre bu, şartlandırma ya da test hasarı olarak kabul edildi. Geliştirilen yöntemde nöronların herhangi bir yüzeye yapışmadan şartlanmalarını sağlamak amacıyla; öncelikle hücrelerin bulunduğu saat camı silikonla kaplandı. Bir in vitro modelde eğer nöronlar şartlanma sırasında akson uzatılırsa, buradan kültür kabına aktarma sırasındaki mekanik işlemler aksonların kopmasına yani kontrolsüz ikinci hasarlanmalara neden

olacaktır. Bu çalışmada, şartlanma sırasında akson uzatmaları engellenen nöronlara ikinci hasar, yani test hasarı, in vitro ortamda, kontrollü olarak laser ışını ile uygulandı.

Nöronlara ayrıştırılarak in vitro şartlanmaları sağlanan arka kök ganglionlarının bu 3 günlük şartlanma sırasında bir araya gelerek küme oluşturmaları bu nöronların birbirlerini yüzey gibi kullanıp akson uzatma ihtimalini akla getirdi. Bu nedenle ve in vitro şartlanmanın etkinliğini test etmek amacıyla; calcein ile silikon kaplı saat camı üzerinde bulunan nöronlar canlı olarak boyandı ve laser taramalı konfokal mikroskopla görüntülendi. Nöronu tüm uzantılarıyla boyayabilen calcein, silikon kaplı saat camında in vitro şartlanan ve bir araya toplanarak küme oluşturan nöronları da boyadı. Sonuç olarak nöronların sadece %1'inin akson uzantısının olduğu saptandı. Bu sonuçtan yola çıkarak nöronların in vitro şartlanma sırasında ihmal edilecek kadar az seviyede akson uzattıkları ve bunun da modelin etkinliğine zarar vermeyeceği sonucuna varıldı.

In vitro ortamda şartlanma sırasında kümeleşen hücreler kültür kaplarına ekilmezden önce tiritüre edildi. Ancak bu işlem sırasında nöronların hasarlanabilecekleri, bunun da modelin güvenilirliğini etkileyebileceği düşünüldü. Bu nedenle herhangi bir hasar ardından hücre içine sızıp hücreyi boyayabilme özelliğine sahip olan lucifer sarısı kullanıldı. Bu çalışmanın sonucunda hücrelerin boyandıkları saptandı. Ancak Petri kabına ekimden sonra nöronların sağlıklı oldukları ve herhangi bir yaralanma belirtisi taşımadıkları gözlemlendiğinden nöronların boyayı endositozla hücre içine almış olabilecekleri düşünüldü. Bunu test etmek için, öncelikle lucifer sarısı ile yapılan deneyler floresan dekstranla tekrar edildi ve benzer bir boyanma bununla da gözlemlendi. Lucifer sarısı yerine floresan dekstran kullanmanın nedeni: lucifer sarısının küçük molekül ağırlığı ile arka kök ganglion hücreleri arasında var olduğu gösterilmiş (Huang ve ark., 2005) ancak nitelikleri çok iyi tarif edilmemiş gap junction'lar aracılığıyla da hücrelere girebilme ihtimali idi. Daha sonra yapılan deneylerde ortamın pH'ı 5.7'ye düşürülerek nöronların endositoz yapmaları engellendi (Davoust ve ark., 1987) ve in vitro şartlanmış nöronların ekim sırasında bu kez floresan dekstranla boyanmadıkları gözlemlendi. Böylece bu son tiritürasyon sırasında nöronların öngörülme-yen bir hasara maruz kalmadıkları kesin olarak gösterilmiş oldu.

Bu çalışmada in vitro olarak şartlanan nöronlarla iki farklı ve yeni test hasarı başarıyla uygulandı. Bunlardan ilki: laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile aksotomi modelidir. Bu modelde nöronların uzattığı aksonlar laser ışını ile kesildi. Bu deney

modeli ile in vivo şartlanma modeli arasında farklılıklar bulunmaktadır. İn vivo ortamda şartlandıktan sonra ikinci aksotomileri ayrıştırma ile yapılan nöronların bir kısmı rejenere olurken; bir kısmı rejenerasyon göstermez. Dolayısıyla bu deney grubunda daha karma bir nöron popülasyonu söz konusudur. Ancak ikinci aksotomileri laser mikrodiseksiyon mikroskopuyla yapılan deney gruplarında özellikle sağlıklı, belli bir akson uzunluğuna ve yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olan nöronların aksotomisi yapıldı. Bu nedenle bu gruptaki nöronların daha hızlı rejenerasyona başlamaları süregelen rejenerasyonun devam etmesinden kaynaklanır. İkinci modelde ise; Petri kabına ekilip 3 gün in vitro olarak şartlanan nöronlar tripsin ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılırken aksonları koptu ve böylece test hasarını almış oldular.

Arka kök ganglionlarını bir bütün olarak şartlandırmak literatürde de rastlanan bir seçenektir ve nöron-glia hücresi organizasyonunu bozmaması nedeniyle önemli bilgiler verebilir (Torigoe ve ark., 1999; Ekström ve ark., 2003). Ancak bunun kaçınılmaz sonucu, iki ayrı hücre tipinin bu etkinin ortaya çıkmasındaki rollerinin ayrıştırılamamasıdır. Ayrıca şartlandırma süresi sonunda ganglionların ayrıştırılarak kültür yapıyor olması, test hasarının da zorunlu olarak bu işlemle yapılmasını beraberinde getirmektedir. Bu nedenlerle ayrılmış nöronlarla gerçekleştirilen in vitro şartlanmanın çok daha kontrol edilebilir bir model olduğunu düşünüyoruz. Yine de tez çalışması kapsamında tüm ganglion şartlanması deneyleri de yapılmış ve sonuçları değerlendirmeye alınmıştır.

5.1.2. Akson rejenerasyonunun ve şartlandırma etkisinin ayrıntılı zaman analizi

Çeşitli faktörlerin akson rejenerasyonuna olan etkisi klasik olarak inkübasyon sürecinin belli bir anında görüntü alınıp akson uzunluk ölçümleri yapılarak incelenmektedir. Şartlandırma hasarı ile ilgili bu güne kadar yapılan çalışmalar da ise akson rejenerasyonu hız analizleri her grup için en uzun aksonların ölçülerek ortalamasının alınması ve bunların karşılaştırılması yöntemiyle yapılmıştır (Cafferty ve ark., 2001; Qui ve ark., 2002; Cafferty ve ark., 2004; Shoemaker ve ark., 2006; Gardiner ve ark., 2007; Sachs ve ark., 2007). Bu çalışmada ise ilk kez kültürdeki nöronlar zaman aralıklı mikroskopi sistemi ile 48 saat boyunca her 15 dakikada bir görüntülenerek takip edildi ve her grup için en az 30 nöronun her saat başı akson uzunluğu hesaplandı. Bu verilerle tüm grupların akson rejenerasyon hızları hesaplanarak

karşılaştırıldı. Ayrıca literatürde ilk kez rejenerasyon aktivitesi adı altında bir başka sayısal değerlendirme yapıldı. Bu analiz belli bir saat aralığında izlenen tüm nöronlar arasında akson rejenerasyonu gösterenlerin oranı ile rejenerasyon hızının çarpılmasıyla elde edildi. Böylece belli bir zaman aralığında tüm nöronların genel durumları (rejenere olan, olamayan ve hatta ölen nöronlar) analize yansıtılmış oldu.

5.1.3. Periferik sinir - nöron ko-kültürleri

Hasarlı periferik sinirden salınan ve retrograd olarak nöronlara taşınan ve/veya lokal olarak etki gösteren çeşitli faktörlerin şartlandırma etkisinin ortaya çıkmasında çok önemli olabileceği düşünülmektedir (Cafferty ve ark., 2004; Cao ve ark., 2006; Shoemaker ve ark. 2006). Bunu araştırmak amacıyla bu tez çalışmasında yeni bir ko-kültür modeli geliştirildi. İlk yapılan denemelerde üç gün öncesinde kesilmiş siyatik sinirin yaklaşık 1 cm'lik proksimal parçası çıkarıldı ve kültür kabında nöronlarla birlikte inkübe edildi. Ancak sinir parçasından dışarı o denli yoğun bir hücre göçü oldu ki, kısa sürede çoğunluğu Schwann hücre morfolojisi taşıyan bu hücreler nöronları ve uzantılarını izlenemez hale getirdi. Bunun üzerine bu siyatik siniri daha küçük parçacıklar halinde agar içine gömmek, böylece glia hücre göçünü engellerken bunların salgılarının nöronlara ulaşmasını sağlamak yoluna gidildi. Teknik yüksek başarı ile uygulandı.

5.2. İn Vivo Şartlanma Etkisi Sanıldığı Kadar Güçlü Değil

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizlerinin sonucunda herhangi bir şartlanmaya maruz kalmayan kontrol grubu nöronlarla in vivo ortamda şartlanan nöronları karşılaştırdığımızda rejenerasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların ilk 12 saat içinde olduğu saptandı. (Şekil 4.60.) Rejenerasyon aktivitesine saat bazında baktığımızda ise; in vivo ortamda şartlanan nöronların 15. saatten sonra aktivitelerinde bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.61.). İlk 24 saat içindeki daha aktif akson rejenerasyonunun ardından ikinci 24 saatte rejenerasyon aktivitesinde azalma olduğu, hatta şartlanan nöronların ölmeye başladıkları gözlemlendi. Bunun sebebi rejenerasyona daha hızlı başlayan bu nöronların bir süre sonra metabolik olarak tükenmeleri olabilir. Bu ilginç sonuçlar ilk 24 saat içerisinde alınan tek bir görüntü ve

akson uzunluk ölçümlerine dayanan ve literatürde sıkça rastlanan çalışmaların şartlandırma etkisini, olduğundan daha büyük gösterdiğini düşündürmektedir.

5.3. Nöronlardaki İnstrinsik Değişiklikler Şartlandırma Etkisi İçin Yeterli Olabilir

Geliştirdiğimiz in vitro şartlandırma modelinin ortaya koyduğu en önemli bulgulardan biri, nöronların şartlandırılmaları için herhangi bir dış faktöre ihtiyaç duymadıklarının gösterilmesidir. Modelimizde dışarıdan herhangi bir faktör eklenmediği halde nöronlar kontrol kültürlerine göre son derece yüksek bir rejenerasyon göstermesi bunu ispatlamaktadır (Şekil 4.62., 4.63.). Öte yandan in vitro modelle şartlandırdığımız nöronlar in vivo şartlananlarla aynı rejenerasyon profili göstermedi (Şekil 4.72., 4.73.). İn vitro şartlananlar rejenerasyona çok daha yoğun ve hızlı bir başlangıç yaptılar. Ancak muhtemelen bu, onların ikinci 24 saatte daha çabuk tükenmelerine neden oldu. İlk 24 saatte gözlenen bu önemli farkın nedeni, in vivo şartlanan nöronlar ekim sırasında ikinci bir aksotomiye uğrarken, diğerlerinin uğramaması olabilir. Diğer taraftan, in vitro şartlandırma sırasında nöronlar nöron dışı hücrelerin salgılarından uzak kalırken, in vivo ortamda nöronlar bir yandan şartlanmayı teşvik eden faktörlere, bir yandan da kısıtlayanlara maruz kalmaktadır. Arka kök ganglionlarının bir bütün olarak şartlandığı ve ardından nöronların ayrıştırılarak ekildiği deneylerde in vivo şartlanan nöronlarınkine benzer bir rejenerasyon hızının gözlenmesi (Şekil 4.74.) bu faktörlerin dolaşım yoluyla gelmeyip, daha çok lokal olarak üretildiğini düşündürmektedir.

5.4. Periferik Sinir Salgıları Şartlandırmaya Katkıda Bulunuyor

Siyatik sinir parçalarıyla birlikte yapılan kokültürler periferik sinirden salınan faktörlerin akson rejenerasyonu üzerindeki etkilerine ışık tuttu. Bu konuda vurgulanması gereken ilk gözlem, şartlanmamış siyatik parçalarının oldukça sınırlı bir etki göstermesi ve etkinin yaklaşık 12. saatten sonra ortaya çıkmasıdır (Şekil 4.21., 4.22.). Bu gecikmenin sebebi, denerve olan siyatik sinirde başta Schwann hücreleri olmak üzere periferik sinir hücrelerinin rejenerasyon moduna geçmek için zamana gereksinim duymaları olabilir (Fu ve Gordon, 1997). Şartlanmış sinir parçaları ise

özellikle rejenerasyon hızını oldukça arttırdı (Şekil 4.7.). Ancak ilk 24 saat içinde gözlenen hızdaki bu artış rejenerasyon aktivitesinde gözlenmedi (Şekil 4.8.). Bu, ancak belli bir nöron popülasyonunun siyatik parçasından salınan faktörlere cevap verdiği anlamına gelebilir. Bu seçici cevap, reseptör sayısındaki farklılıklara bağlı olabileceği gibi, nöronların rejenerasyon için gerekli protein içeriklerinin farklı olmasına da bağlı olabilir. Şartlı siyatik kokültürlerinde ikinci 24 saatte rejenerasyon aktivitesinde de anlamlı artış olması bu süre içinde daha fazla nöronun reseptör sayısında artış ya da salgılanan faktörlere cevap verir hale gelmesini göstermektedir.

5.5. İkinci Aksotomi (Test hasarı) Deneyleri

Bu çalışmada *in vivo* şartlandırma etkisinin iki bileşeni, şartlandırma hasarı ve test hasarının her ikisinin birlikte taklit edilebilmesi için deneyler yapıldı. Öncelikle ganglionların çıkarılması sırasında nöronların şartlandırma hasarına maruz kaldıkları varsayıldı. Test hasarı uygulaması için ise üç ayrı strateji uygulandı. Birincisinde bir bütün olarak şartlanan arka kök ganglionları ekim için mekanik ve enzimatik ayıştırmaya maruz bırakıldı ve bu süreçte ekimden hemen önce test hasarını da almış oldular. “İki hasar” kriteri açısından *in vivo* şartlanmaya en çok benzeyen deney paradigması buydu ve gerek rejenerasyon hızı ve gerekse rejenerasyon aktivitesi açısından *in vivo* şartlanan nöronlarınkine oldukça benzer grafikler ortaya koydu (Şekil 4.74., 4.75.). İkinci yöntem, *in vitro* şartlanan nöronların ekimden bir süre sonra tripsin ile kaldırılmaları ve tekrar ekilmeleri idi. Bu sırada akson uzatmış olan nöronların aksonları koptu ve test hasarını almış oldular. Ancak bu modelde ilk ekimden itibaren nöronların akson uzatmak için kaynaklarını kullanmaları ikinci kez ekildiklerinde bir dezavantaj olabilirdi. Gerçekten de tripsin aksotomi sonrası hem rejenerasyon hızı ve hem de rejenerasyon aktivitesi oldukça azaldı (Şekil 4.33., 4.34.). Üçüncü yöntem ise; kültürdeki nöronların uzayan aksonlarının laser ışını ile kesilerek test hasarlarının uygulanması oldu. Bu yöntemin dezavantajı laser ışını ile aksotomi olan her nöronun daha sonra takip edilerek analize dahil edilmesiydi. Oysa ki; *in vivo* şartlanmış nöronlardan ileri derecede hasarlanmış olanlar kültüre ekim aşamasında elenmekte, bu nöronlar kültür kabının tabanına yapışmamaktadır. Böylece izlenen nöronlar sadece rejenerasyon kapasitesine sahip sağlıklı nöronlar olacaktır. Nitekim laser aksotomisi

sonrası gerek rejenerasyon hızı ve gerekse rejenerasyon aktivitesi oldukça düşük bir seyir izledi. Ancak bu deneylerle ilgili önemli bir özellik aksotomi uygulanan nöronlardan ancak küçük bir yüzdesinin rejenerasyon yapmasıydı. Bu nedenle bu grupların diğer gruplarla karşılaştırılması düşük örnek sayısı nedeniyle istatistik açıdan çok güvenilir sonuçlar vermedi. Bu sorunu aşmak için laser aksotomisi yapılan grupları karşılaştırabilmek için ikinci aksotomi sonrası akson rejenerasyonu gösteren nöron yüzdeleri esas alındı. Bu testler, şartlanmış siyatik sinir parçalarından salınan faktörlerin laser aksotomisi sonrasında rejenerasyon ihtimalini anlamlı derecede artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.130.).

5.6. LIF Şartlandırma Etkisi İçin Çok Önemli Bir Faktör

Şartlandırma hasarı etkisi, aksotomi sonucunda meydana gelen çeşitli hücresel cevaplardan biridir. Genel olarak bu değişiklikleri ortaya çıkaran iki sinyal olduğu kabul edilir. Bunlardan ilki, hasarla indüklenen ve rejeneratif tepkiyi arttıran pozitif sinyallerdir. İkincisi ise periferik hedeften köken alan ve rejenerasyonu inhibe edici etkiye sahip olan negatif sinyallerdir. Pozitif sinyale en iyi örneklerden biri de sitokin ailesinden olan LIF'tir. Sağlam sinir sisteminde henüz varlığı gösterilmemiş olan LIF mRNA'sı aksotomiyi takiben hasar bölgesinde nöron dışı hücrelerde artar ve arka kök ganglion hücrelerine retrograd olarak taşınır (Banner ve Patterson, 1994; Curtis ve ark., 1994; Sun ve Zigmond, 1996). Sitokinler ile ilgili genleri kusurlu olan farelerle yapılan deneylerle şartlandırma hasarı etkisi daha önce çalışılmıştır. LIF -/- fareden alınan arka kök ganglion nöronlarının, bir şartlandırma hasarı sonrasında, hücre kültürlerinde akson büyümesinin kontrol grubu hayvanların nöronlarıyla karşılaştırıldığında % 40 azaldığı gözlenmiştir (Cafferty ve ark., 2001). Sitokinler JAK-STAT ve MAPK yolaklarını aktive eden gp130 reseptör kompleksleri aracılığıyla sinyal iletimlerini gerçekleştirirler (Bauer ve ark., 2007). Bu bulguya göre yapılan bir çalışmada janus kinaz (JAK) aktivitesi farmakolojik ajanlarla bloklandıktan sonra duyu nöronlarında şartlandırma hasarı ile artan akson uzamasının azaldığı saptanmıştır (Liu ve Snider, 2001; Qui ve ark., 2005). Tüm bu çalışmalar ve bu tez çalışmasında gözlenen şartlandırılmış siyatik parçalarından salgılanan faktörlerin rejenerasyon üzerindeki olumlu etkiler yapmış olması, LIF'in şartlanma etkisindeki rolüyle ilgili bir seri deney yapmayı gerekli kıldı.

Bu deneylerde LIF, LIF bloklayıcı antikor (anti-LIF) ve LIF'le etkileşimli etkileri olduğu bilinen NGF kullanıldı.

5.7. LIF Aksotomi Sonrası Nöronlarda Sentezleniyor

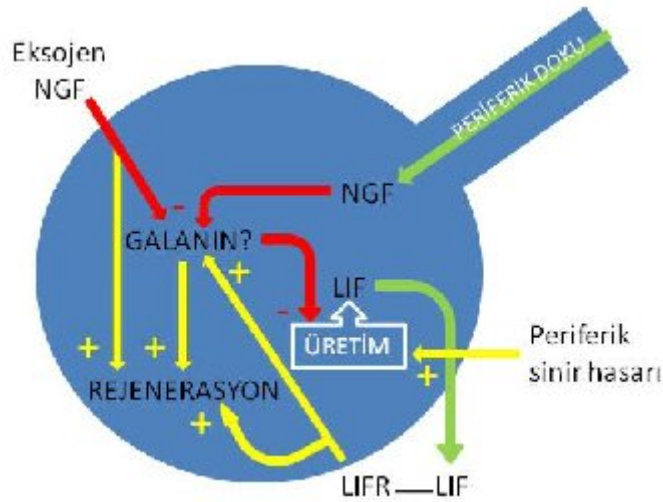
Bu çalışmada yapılan ilk LIF deneyi, *in vitro* şartlandırma sırasında LIF aktivitesini bloklamak oldu. Ancak sonuçlar oldukça şaşırtıcı idi; anti-LIF varlığında şartlanan nöronlar rejenerasyon hız ve aktivitesinden bir şey kaybetmedikleri gibi (Şekil 4.48, 4.49), uzattıkları aksonlar çok daha kalındı (Şekil 4.132., 4.134.). Bu gözlemleri açıklayabilmek amacıyla LIF ve LIF reseptörü immünohistokimyası yapıldı ve bu nöronların oldukça yüksek miktarda LIF içerdikleri görüldü (Şekil 4.136., 4.137., 4.138., 4.139., 4.140.). Nöronlarda endojen LIF üretimi oluyor anlamına gelen bu sonuç literatürde olmayan yeni bir bulgudur. Ardından yapılan deneylerde herhangi bir faktör olmadan *in vitro* şartlanan nöronlarda ve hatta kontrol kültürlerindeki nöronlarda dahi LIF varlığı gösterildi. Hayvanlardan çıkarılır çıkarılmaz tespit edilen arka kök ganglion kesitlerinde oldukça düşük bir LIF seviyesi tespit edilirken, siyatik sinir kesisinden bir saat sonra çıkarılan ganglionlarda dahi LIF seviyesi oldukça yüksek bulundu. LIF reseptör seviyesi de genellikle LIF seviyesiyle paralellik gösterdi; bunun tek istisnası kontrol kesitlerinde LIF reseptör immünoaktivitesinin LIF'inkinden göreceli olarak daha yüksek olmasıydı. Mevcut literatüre göre LIF sadece hasarlanan periferik sinir bölgesinde üretilir ve arka kök ganglion nöronlarına retrograd olarak taşınır ki bu hasar sonrası üçüncü günü bulur (Thompson ve ark., 1997). Bu çalışmadaki deneylerde siyatik sinir kesisini takip eden bir saat içinde LIF'in retrograd olarak nöronlara ulaşması mümkün gözükmemektedir. Bu süre transkripsiyon aşamasıyla birlikte yeni LIF sentezi için de oldukça kısadır. Bu nedenle LIF mRNA'sının primer duyu nöronlarında sürekli olarak üretiliyor olması, hasar sonrasında bunların hızla translasyona uğraması daha olası bir ihtimal olarak görünmektedir.

Her ne kadar bu hipotez gözlemlerimizin bir kısmını açıklasa, da diğerleri endojen LIF'in etkileri ve üretiminin kontrolü ile ilgili daha karmaşık mekanizmaların olabileceğini düşündürmektedir.

Öncelikle anti-LIF'in nöronların şartlanmasını etkilememesi, aksine daha kalın aksonlara neden olması LIF'in hücre dışına salgılanıp otokrin etki göstermesinin yanı

sıra bazı araştırmacıların savunduğu gibi reseptörüyle bir endozom içinde bir araya gelip hücre içinde aktivasyon gösteriyor olabileceğini akla getirmektedir (O'Brien ve Nathanson, 2007). Böyle bir durumda kompleks negatif ve pozitif geri bildirim mekanizmalarının bulunması beklenebilir.

Tüm deney aşamalarında NGF'ye maruz bırakılan nöronlarda, ekim sonrası oldukça yüksek LIF immünoreaktivitesi gözlemlendi. LIF ve NGF arasında daha önce gösterilmiş olan karşılıklı ilişki, en açık şekliyle galanin (GAL) nöropeptidinin gen ifadesi üzerinde karşımıza çıkmaktadır. Yetişkin hayvanlarda arka kök ganglion nöronlarında normal şartlarda galanin geninin ifadesi azdır; ancak aksotomi sonrasında artış gösterir. Daha önceki çalışmalarda GAL gen ifadesini LIF'in arttırdığı NGF'nin ise azalttığı gösterilmiştir (Thompson ve ark., 1998; Öztürk ve Tonge, 2001). Galanin +/- farede siyatik sinir hasarından sonra rejenerasyonun yaklaşık olarak 3 hafta boyunca yavaşladığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, bu mutant farelerin kültürü yapılan arka kök ganglion nöronlarının akson büyümesinin kontrol grubu farelerin nöronlarıyla karşılaştırıldığında önemli miktarda az olduğu ve bu farkın da kültür ortamına galanin eklenerek ortadan kalktığı saptanmıştır (Holmes ve ark., 2000; Mahoney ve ark., 2003). Bu özellikleriyle GAL'in, şartlanma etkisinin aktörlerinden biri olması beklenebilir. Bu tez çalışmasında NGF ile yapılan deneylerde LIF ve LIF reseptör seviyesindeki artışın hücre boyutuyla negatif korelasyonu olduğunu gözledik. Bunun anlamı, NGF'nin, yüksek affiniteli TrkA reseptörlerinin bulunduğu küçük nöronlarda LIF seviyesinde artışa neden olmasıdır. Her ne kadar bu çalışmada GAL ile ilgili deneyler yapılamamış olsa da, tüm bu gözlemler ve literatür ışığı altında, süpekülatif bir yaklaşımla şöyle bir hipotez kurmak mümkündür: Normal şartlar altında periferik dokulardan taşınan NGF, GAL sentezini baskılar. Periferik sinir hasarı sonrası nöronlara gelen NGF kesilirken, henüz bilinmeyen bir mekanizmayla nöronda ani bir LIF sentezi başlar. Üretilen LIF ekzositozla dışarıya salınır ve otokrin ve parakrin olarak etki gösterir. LIF bir yandan kendisi nöronun rejenerasyon kapasitesini arttırırken bir yandan da GAL yapımını uyarır. Hücre içinde artan GAL ise LIF sentezini negatif geri bildirim ile sınırlar. Dışarıdan eklenen eksojen NGF, GAL sentezini inhibe ederek GAL'nin LIF üzerindeki baskısını kaldırır, böylece hücre içinde LIF seviyesi daha da artar (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Primer duyu nöronunda fizyolojik şartlarda ve hasar sonrası LIF, NGF ve GAL arasındaki hipotetik ilişki.

5.8. LIF Akson Rejenerasyonunu Destekliyor

Gerek in vivo ve gerekse in vitro şartlandırma sırasında nöronların yüksek miktarlarda endojen LIF üretmesi bu faktörün şartlanmada anahtar rol oynadığını düşündürmektedir. In vitro şartlanma sırasında kültür ortamına eksojen LIF ekleyerek yapılan deneylerde rejenerasyon hız ve aktivitesinde herhangi bir değişikliğin meydana gelmemesi (Şekil 4.36., 4.37.), şartlanma sırasında nöronların tüm reseptörlerini doyuracak kadar LIF üretebildiklerini göstermektedir. Öte yandan diğer bazı deneyler kültür kabına ekimden sonra endojen LIF'in rejenerasyon için ne derece önemli olduğunu ortaya koymuştur. Nöronlar sadece şartlanma sırasında anti-LIF'e maruz bırakıldıklarında bu onların ekim sonrası davranışlarını çok az etkilerken (Şekil 4.48., 4.49.), ekim sonrası anti-LIF uygulaması devam ettiğinde hem rejenerasyon hızının ve hem de rejenerasyon aktivitesinin çok düşük seviyelere indiği gözlemlendi (Şekil 4.54., 4.55.).

Bu sonuçlar, in vivo ya da in vitro şartlanma sırasında nöronların biriktirdiği LIF'in kültür kabına ekimden sonra gözlenen rejenerasyon artışından öncelikli olarak sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Eksojen LIF'in eklenmesi, şartlanmamış nöronlar üzerinde, şartlanmış ya da şartlanmamış siyatik parçalarından daha kuvvetli bir etki yapmıştır (Şekil 4.94., 4.95., 4.98., 4.99.).

Bu çalışmada LIF'in bir başka etkisi akson kalınlığı üzerinde gözlemlendi. In vitro şartlanma sırasında eksojen LIF ve anti-LIF'e maruz kalan hücreler daha kalın akson uzattılar. LIF'in bu etkisi başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (Tham ve ark., 1997; Öztürk ve Tonge, 2001). Ancak ilginç olan nokta, şartlanma sırasında uygulanan LIF'in rejenerasyon hız ve aktivitesi üzerine etkisi olmamasına rağmen, akson kalınlığını arttırmasıdır. Anti-LIF'in LIF'e benzer etki göstermesi ise daha ilginç bir sonuçtur. Aslında şekil 5.1.'de özetlenen hipotetik modelimiz bu gözlemi açıklayabilmektedir. Buna göre; hücre dışına salınan LIF'in anti-LIF ile bloklanması galanin üzerindeki uyarıcı etkiyi kaldırır, galanin seviyesinin düşmesi ile endojen LIF üretimi üzerindeki inhibitör etki kalkar. Şartlanma sırasında bol miktarda LIF depolayan hücreler ekim sonrası bu faktörün etkisiyle daha yoğun bir rejenerasyon gösterirler. Bu hipotezin en önemli sorunu, gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirmede anti-LIF uygulamasının hücrelerde LIF artışını sağlamadığının gözlenmesidir. Bunun bir açıklaması, LIF sentezinin belki sadece transkripsiyon aşamasına kadar uyarılması olabilir. Buna cevap in situ hibridizasyon tekniği ile verilebilir. Bir başka olasılık, bu deneylerdeki muhtemel teknik hata payı olabilir ki; deney tekrarı ile bu test edilmelidir.

Tüm şartlanan nöronların gösterdiği ortak bir özellik uzayan aksonların yaptıkları dallanmalardaki azalma idi. Bununla ilgili ipucuna literatürde de rastlanmakta (Ng ve ark., 2003) olup; fonksiyonel faydası uzayan aksonların dallanmayarak kaynak ve zaman tasarrufu yapması, böylece hedef dokulara daha hızlı ulaşması olabilir.

5.9. Sonuç ve Yorum

Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde; bir periferik sinir hasarı sonrası meydana gelen olaylar ve şartlandırma etkisi hakkında şöyle bir senaryo kurulabilir:

Periferik sinir kesisi primer duyu nöronlarına giden NGF gibi hedef doku kökenli faktörleri kesintiye uğratar. Bu, normal şartlarda baskı altında tutulan bir takım faktörlerin sentezini (galanin?) serbestleştirir. Periferik sinir hasarı aynı zamanda nöronlarda zaten bol miktarda bulunan LIF transkriptinin hızlı bir şekilde translasyona girmesini ve hücrelerin endojen LIF üretmesini sağlar. Üretilen LIF ekzositozla dışarı salgılanır, otokrin ve parakrin olarak nöronlar üzerinde etki gösterir. Bu etkilerden biri

LIF'in rejenerasyon için gerekli protein sentezini uyarmasıdır, bunların arasında LIF'in kendi üretimini sınırlayacak olanlar da vardır (galanın?). Hasarı takiben başta Schwann hücreleri olmak üzere periferik sinir hücreleri mod değiştirir ve yoğun bir faktör sentezleme ve salgılama faaliyetine girişirler. Bu faktörlerin arasında LIF de vardır ve hasarın yaklaşık 3. gününde bu faktör retrograd olarak nöronlara taşınmaya başlanır. Böylece rejenerasyon moduna giren nöronların kaynaklarını LIF üretmek için kullanma zorunlulukları kalmaz; yapısal proteinlerin sentezi daha ön plana çıkar. Hasar sonrası hücre içinde LIF seviyesinin endojen yapım ya da periferik taşımayla yeterince yüksek seviyeye çıktığı herhangi bir zaman diliminde eğer ikinci bir hasar gerçekleşirse; zaten tüm kaynaklarıyla rejenerasyon moduna girmiş olan nöronlar ilkinde göre daha hızlı bir akson uzamasını destekleyebilirler ki; şartlandırma etkisi olarak adlandırılan fenomen budur.

Bu özetlenen model, daha iyi anlaşılması adına tek bir faktöre, en önemli aktör olduğunu düşündüğümüz LIF'e indirgenmiştir. Ancak olaylar zincirinde çok daha fazla faktörün ve etkileşimin olduğu kesinlikle kabul edilmelidir.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yeni deneysel modellerle, çok farklı kombinasyonlarda deneyler yapıldı. Bu haliyle çalışmanın kendi alanında oldukça yenilikçi bir araştırma yaklaşımı getirdiğini düşünüyoruz. Yapılan mevcut analiz, karşılaştırma ve yorumlar ancak çalışmanın ana hatlarını irdeleyebilmiştir. Üzerinde durulamayan daha pek çok kombinasyonun her birinin başlı başına bir araştırma konusu olabileceği ve şartlandırma etkisi hakkında yeni bilgiler verebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., Lindsay, R. M., 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* (374): 450-453.
- Agasse, F., Roger, M., Coronas, V., 2004. Neurogenic intact or apoptotic non-neurogenic areas of adult brain release diffusible factors that differentially modulate the development of subventricular zone cell cultures. *Eur. J. Neurosci.* (19): 1459-1468.
- Altar, C. A., DiStefano, P. S. 1998. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci.* (21): 433-437.
- Altar, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M., Wiegand, S. J. 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* (389): 856-860.
- Baird, A. 1994. Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic factors *Cur. Op. Neur.* (4): 78-86.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., Miller, F. D. 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell Biol.* (140): 911-923.
- Banner, L. R., Moayeri, N. N., Patterson, P. H. 1997. LIF is expressed in astrocytes following cortical brain injury. *Exp. Neurol.* (147): 1-9.
- Banner, L. R., Patterson, P. H. 1994. Major changes in the expression of the mRNAs for cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor and its receptor after injury to adult peripheral nerves and ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (91): 7109-7113.
- Barakat-Walter, I. 1996. Brain derived neurotrophic factor like immunoreactivity is localized mainly in small sensory neurons of rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci. Methods* (68): 281-288.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* (1): 549-553.

- Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Raccurt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyse, E., Patterson, P. H., 2003. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *The Journal of Neuroscience*. (23): 1792-1803.
- Bauer, S., Bradley, J. K., Patterson, P. H., 2007. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nature Reviews Neuroscience*. (8): 221-232.
- Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., Munson, J. B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S. B., Priestley, J. V., 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J. Neurosci*. (18): 3059-3072.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., Rosenthal, A., 1991. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* (7): 857-866.
- Bibel, M., Barde, Y. A., 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*. (14): 2919-2937.
- Bisby, M. A., Keen, P., 1985. The effect of a conditioning lesion on the regeneration rate of peripheral nerve axons containing substance P. *Brain Res*. (336): 201-206.
- Bisby, M. A., Pollock, B., 1983. Increased regeneration rate in peripheral nerve axons following double lesions: enhancement of the conditioning lesion phenomenon. *J. Neurobiol*. (14) 467-472.
- Bradbury, E. J., McMahon, S. B., Ramer, M. S., 2000. Keeping in touch: sensory neuron regeneration in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci*. (21): 389-394.
- Brunner, G., Gabilove, J., Rifkin, D. B., Wilson, E. L., 1991. Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol anchored heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol*. (114): 1275-1283.
- Brushart, M. T., Gerber, J., Kessens, P., Chen, Y., Royall, R. M., 1998. Contributions of pathway to preferential motor reinnervation. *The Journal of Neuroscience*. 18, (21): 8674-8681.

- Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., Davies, A. M., 1995. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* (15): 821-828.
- Burgess, W. H., Maciag, T., 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* (58): 575-606.
- Cafferty, W. B. J., Gardiner, N. J., Das, P., Qui, J., McMahon, S. B., Thompson, S. W. N., 2004. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in Interleukin-6 knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*. 24, (18): 4432-4443.
- Cafferty, W. B. J., Gardiner, N. J., Gavazzi, I., Powell, J., McMahon, S. B., Heath, J. K., Munson, J., Cohen, J., Thompson, S. W. N., 2001. Leukemia Inhibitory Factor determines growth status of injured adult sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*. 21, (18): 7161-7170.
- Cao, Z., Gao, Y., Bryson, J.B., Hou, J., Chaudhry, N., Siddig, M., Martinez, J., Spencer, T., Carmel, J., Hart, R. B., Filbin, M. T., 2006. The cytokine IL6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. *The Journal of Neuroscience*. 26 (20): 5565-5573.
- Carlson, R. C. 1983. Delayed induction of the cell body response and enhancement of regeneration following a conditioning lesion of frog peripheral nerve at 15 °C, *Brain Res.* (279):9-18.
- Carroll, S. L., Silos-Santiago, I., Frese, S. E., Ruit, K. G., Milbrandt, J., Chao, M. V., Hempstead, B. L. 1995. p75 and Trk: a two – receptor system. *Trends Neurosci.* (18): 321-326.
- Chao, M. V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* (4): 299-309.
- Chao, M. V., Rajagopal, R., Lee, F. S., 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical Science.* (110): 167-173.
- Cho, E. Y. P., So, K. F., 1989. Regrowth of retinal ganglion cell axons into a peripheral nerve graft in the adult hamster is enhanced by a concurrent optic nerve crush. *Exp. Brain Res.* (78): 567-574.

- Cohen, A., Bray, G. M., Aguayo, A. J., 1994. Neurotrophin-4/5 (NT-4/ 5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J. Neurobiol.* (8): 953-959.
- Cohen, S., 1960. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (46): 302-311.
- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., Varon, S., 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* (17): 2295-2313.
- Conover, J. C, Yancopoulos, G. D., 1997. Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice. *Rev. Neurosci.* (8): 13-27.
- Conover, J. C., Erickson, J. T., Katz, D. M., Blanchi, L. M., Poueymirou, W. T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N. Y., Boland, P., Friedman, B., Wiegand, S., Vejsada, R., Kato, A. C., DeChiara, T. M., Yancopoulos, G. D., 1995. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* (375): 235-238.
- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., Philips, H., 1994. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* (76): 10001-10011.
- Curtis, R., Adryan, K. M., Zhu, Y., Harkness, P. J., Lindsay, R. M., DiStefano, P. S., 1993. Retrograd axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature.* (365): 253-255.
- Curtis, R., Scherer, S. S., Somogyi, R., Adryan, K. M., Ip, N. Y., Zhu, Y., 1994. Retrograd axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron.* (12): 191-204.
- Dahlin, L., B., 2004. The biology of nerve injury and repair. *Journal of The American Society For Surgery of The Hand.* (3):143-155.

- Davies, A. M., Horton, A., Burton, L. E., Schmelzer, C., Vandlen, R., Rosenthal, A., 1993. Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *J. Neurosci.* (13): 4961-4967.
- Davoust, J., Gruenberg, J., Howell, K. E., 1987. Two threshold values of low pH block endocytosis at different stages. *The EMBO Journal.* (6): 3601-309.
- Dechant, G., Barde, Y. A., 2002. The neurotrophin receptor of p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* (5): 1131-1136.
- Eckenstein, F. P., Shipley, G. D., Nishi, R., 1991. Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. *J. Neurosci.* (11): 412-419.
- Edbladh, M., Edstrom, A., 1989. Environmental factors contribute to the enhanced regeneration of frog sciatic sensory axons by a conditioning lesion. *Acta Physiol. Scand.* (135): 169-172.
- Ekström, P. A. R., Mayer, U., Panjwani, A., Pountney, D., Pizzey, J., Tonge, D. A., 2003. Involvement of $\alpha 7 \beta 1$ integrin in the conditioning lesion effect on sensory axon regeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience.* (22):383-395.
- Eriksson, N. P., Aldskogius, H., Grant, G., Lindsay, R. M., Rivero-Melian, C., 1997. Effects of NGF, BDNF and NT-3 on the laminar distribution of transganglionically transported cholera toxin B subunit in the spinal cord dorsal horn following transection of the sciatic nerve in the adult rat. *Neuroscience.* (78): 863-872.
- Ernfors, P., Lee, K. F., Jaenisch, R., 1994a. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* (368): 147-150.
- Ernfors, P., Rosario, C. M., Merlio, J. P., Grant, G., Aldskogius, H., Persson, H., 1993. Expression of mRNAs for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (17): 217-226.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., Persson, H., 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* (4):511-526.

- Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., Jaenisch, R., 1994b. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* (77): 503-512.
- Escary, J. L., Perreau, J., Dumenil, D., Ezine, S., Brulet, P., 1993. Leukemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* (363): 361-364.
- Fawcett, J. P., Bamji, S. X., Causing, C. G., Aloyz, R., Ase, A. R., Reader, T. A., McLean, J. H., Miller, F. D., 1998. Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J. Neurosci.* (18): 2808-2821.
- Forman, D. S., McQuarrie, I. G., Labore, F. W., Wood, D. K., Stone, L. S., Bradock, C.H., Fuchs, D.A., 1980. The timecourse of conditioned lesion effect on axonal regeneration. *Brain Res.* (182): 180-185.
- Friedman, B., Scherer, S. S., Rudge, J. S., Helgren, M., Morrissey, D., McClain, J., Wang, D., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay R. M., Ip, N. Y., 1992. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron*. (9): 295-305.
- Fu, Y. S., Gordon, T., 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular Neurobiology*. 14 (1): 67-116.
- Funakoshi, H., Frisen, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V. M. K., Persson, H. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.* (123): 455-465.
- Gardiner, N. J., Moffatt, S., Fernyhough, P., Humphries, M. J., Streuli, C. H., Tomlinson, D. R., 2007. Preconditioning injury-induced neurite outgrowth of adult rat sensory neurons on fibronectin is mediated by mobilisation of axonal $\alpha 5$ integrin. *Molecular and Cellular Neuroscience*. (35): 249-260.
- Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J., Nice, E. C., Kilso, A., Metcalf, D., 1987. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* (6): 3995-4002.
- Gorin, P. D., Johnson, E. M. Jr., 1980. Effects of long term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: an experimental autoimmune approach. *Brain Res.* (198): 27-42.

- Gospodarowicz, D., Cheng, J., 1986. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell. Physiol.* (128): 475-484.
- Greenberg, S. G., Lasek, R. J., 1988. Neurofilament protein synthesis in DRG neurons decreases more after periferal axotomy than after central axotomy. *J. Neurosci.* (8): 1739-1746.
- Grothe, C., Meisinger, C., Hertenstein, A., Kurz, H., Wewetzer, K., 1997. Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neurosci.* (76): 123-135.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2001. *Tıbbi Fizyoloji*, 1. baskı. Yüce Yayınları A. Ş. & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul. 1024.
- Halböök, F., Ibáñez, C. F Persson, H., 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* (6):845-858.
- Hall, M. E., 1982. Changes in synthesis of specific proteins in axotomized dorsal root ganglia. *Exp. Neurol.* (76): 83-93.
- Hammarberg, H., Piehl, F., Cullheim, S., Fjell, J., Hokfelt, T., Fried, K., 1996. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuro Rep.* (7): 857-860.
- Hendry, I. A., 1975. The response of adrenergic neurons to axotomy and nerve growth factor. *Brain Res.* (94): 87-97.
- Hendry, I. A., Campbell, J., 1976. Morphometric analysis of rat superior cervical ganglion after axotomy and nerve growth factor treatment. *J. Neurocytol.* (5): 531-560.
- Heymann, D., Godard, A., Raher, S., Bentouimou, N., Blanchard, F., Cherel, M., Hallet, M-M., Jaques, Y., 1996. Leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) high affinity binding require additional receptor subunits besides GP130 and GP190. *Cytokine* (8): 197-205.
- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., Barde, Y. A., 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult Mouse brain. *EMBO J.* (9): 2459-2464.

- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y. A., 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived growth factor family. *Nature* (344): 339-341.
- Holmes, F.E., Mahony, S., King, V.R., Bacon, E., Kerr, N. C. H., Pachnis, V., Curtis, J.V., Wynick, D., 2000. Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (97): 11563-11568.
- Hory-Lee, F., Russell, M., Lindsay, R. M., Frank, E., 1993. Neurotrophin- 3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (90): 2613-2617.
- Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q. Sergeev, V., Ubink, R., Diez, M., 2000. Neuropeptides: an overview. *Neuropharmacology*. (39): 1337-1356.
- Huang, D. W., McKerracher, L., Braun, P. E., David, S., 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron*. (24): 639-647.
- Huang, T. Y., Cherkas, P. S., Rosenthal, D. W., Hanani, M., 2005. Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res.* 1036, 42-9.
- Huang, E. J., Liu, W., Fritsch, B., Bianchi, L.M., Reichardt, L. F., Xiang, M., 2001. Brn3a is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development*. (128): 2421-2432.
- Huang, E. J., Reichardt, L. F., 2003. Trk receptors: roles in signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* (72): 677-642.
- Hu-Tsai, M., Winter, J., Emson, P. C., Woolf, C., 1994. Neurite outgrowth and GAP 43 expression in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons: effects of NGF or prior peripheral axotomy. *J. Neurosci. Res.* (39): 634-645.
- Ibáñez, C. F., Ernfors, P., Timmusk, T., Ip, N. Y., Arenas, E., Yancopoulos, G. D., Persson, H., 1993. Neurotrophin-4 is a target-derived neurotrophic factor for neurons of the trigeminal ganglion. *Development* (117): 1343-1353.
- Ip, N. Y., Ibáñez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., LeBeau, M. M., Espinosa, R., Squinto, S. P., Persason, H., Yancopoulos, G., 1992. Mammalian neurotrophin 4: structure, chromosomal location, tissue

- distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (89): 3060-3064.
- Ito, Y., Yamamoto, M., Li, M., Mitsuma, N., Tanaka, F., Doyu, M., Suzumura, A., Mitsuma, T., Sobue, G., 2000. Temporal expression of mRNAs for neuropoietic cytokines, interleukin-11 (IL-11), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1) and their receptors (IL-11R α and OSMR β) in peripheral nerve injury *Neurochem. Res.* (25): 1113-1118.
- Ito, Y., Yamamoto, M., Mitsuma, N., Mei, L. I., Hattori, N., Sobue, G., 1998. Expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR α , LIFR β , IL-6R α , and gp130) in human peripheral neuropathies. *Neurochem. Res.* (26): 51-58.
- Jacob, J. M., McQuarrie, I.G., 1991. Axotomy accelerates slow component b of axonal transport. *J. Neurobiol.* (22): 570-582.
- Jacob, J. M., McQuarrie, I. G., 1993. Accelerated axonal outgrowth in rat sciatic nerve at one week after axotomy. *J. Neurobiol.* (24): 356-367.
- Jacob, J., M., Croes, S., A., 1998. Acceleration of axonal outgrowth in motor axons from mature and old F344 rats after a conditioning lesion. *Experimental Neurobiology*.(152):231-237.
- Ji, R. R., Zhang, Q., Zhang, X., Piehl, F., Reilly, T., Pettersson, R. F., Hökfelt, T., 1995. Prominent expression of bFGF in dorsal root ganglia after axotomy. *Eur. J. Neurosci.* (7): 2458-2468.
- Johnson, D. E., Williams, L. T., 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* (60): 1-41.
- Johnson, Jr., E. M., Gorin, P. D., Brandeis, L. D., Pearson, J., 1980. Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* (210): 916-918.
- Johnson, Jr., Osborne, P. A., Rydel, R. E., Schmidt, R. E., Pearson, J. 1983. Characterization of the effects of autoimmune nerve growth factor deprivation in the developing guinea pig. *Neurosci.* (1983): 631-642.

- Kaplan, D. R. , Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., Parada, L. F., 1991. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* (252): 554-558.
- Kaplan, D. R., Miller, F. D., 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* (10): 381-391.
- Katoh, Y., Katoh M., 2005. Comparative genomics on FGF7, FGF10, FGF22 orthologs, and identification of FGF25. *Int. J. Mol. Med.* 16 (4): 767-770.
- Keierszenbaum, A. L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık. Ankara. 618.
- Kessler, J. A., Black, I. B., 1980. Nerve growth factor stimulates the development of substance P in sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (77): 649-652.
- Kiefer M. C., Stephans, J. C., Crawford, K., Okino, K., Barr, P. J., 1990. Ligand affinity cloning and structure of a cell surface heparan sulfate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (87): 6985-6989.
- Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M., 1991a. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* (65): 189-197.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., Barbacid, M., 1992. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* (8): 947-956.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F., Barbacid, M., 1991b. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* (66): 395-403.
- Klein, R., Silos-Santiago, I., Sneyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Mang, L., Snider, W. D., Barbacid, M., 1994. Disruption of the neurotrophin- 3 receptor gene TrkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movement. *Nature* (368): 249-251.
- Klein, R., Smeyne, R. J., Wurst, W., Long, L. K., Auerbach, B. A., Joyner, A. L., Barbacid, M., 1993. Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* (75): 113-122.
- Kline, D. G., Hudson, A. R., 1995. *Nerve injuries: Operative results for major nerve injuries, enrapments and tumors*. Saunders Philadelphia.

- Koeberle, P. D., Bal, A. K., 1998. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res.* (38): 1505-1515.
- Koliatsos, V. E., Cayouette, M. H., Berkemeier, L. R., Clatterbuck, R. E., Price, D. L., Rosenthal, A., 1994. Neurotrophin 4/5 is a trophic factor for mammalian facial motor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (91): 3304-3308.
- Lamballe, F., Kelin, R., Barbacid, M., 1991. trkC, a new member of trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* (66): 967-679.
- Lankford, K., L., Waxman, S., G., Kocsis J., D., 1998. Mechanisms of enhancement of neurite regeneration in vitro following a conditioning sciatic nerve lesion. *The Journal of Comparative Neurology.* (391): 11-29.
- Lanners, H. N., Grafstein, B., 1980. Effect of a conditioning lesion on regeneration of goldfish optic axons: ultrastructural evidence of enhanced outgrowth and pinocytosis. *Brain Res.* (196): 547-553.
- Leclere, P., Ekström, P., Edström, A., Priestley, J., Averill, S., Tonge, D. A., 1997. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on axonal growth and apoptosis in adult mammalian sensory neurons in vitro. *Neurosci.* (82): 545-558.
- Lefcort, F., Clary, D. O., Rusoff, A. C., Reichardt, L. F., 1996. Inhibition of the NT-3 receptor TrkC, early in chick embryogenesis, results in severe reductions in multiple neuronal subpopulations in the dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* (16): 3704-3713.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengeler B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y. A., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* (341): 149-152.
- Levi-Montalcini, R., 1951. Selective growth-stimulating effects of Mouse sarcomas on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryos. *J. Exp. Zool.* (116): 321-362.
- Levi-Montalcini, R., Angeletti, P. V., 1968. Nerve growth factor. *Physiological Review* (48): 534-569.
- Levi-Montalcini, R., 1987. The NGF 35 years later. *Science.* (237): 1154-1162.
- Lewin, G. R., Barde, Y. A., 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* (19): 289-317.

- Li, L., Oppenheim, R. W., Lei, M., Houenou, L. J., 1994. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J. Neurobiol.* (25): 759-766.
- Lieberman, A. R., 1971. The axon reaction: A review of principle features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* (14): 49-124.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., Collins, F., 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* (260): 1130-1132.
- Lindsay, R. M., 1988a. *The role of neurotrophic factors in development, maintenance and regeneration of sensory neurons. In The Making of the Nervous System.*, Oxford U.P. 148-165.
- Lindsay, R. M., 1988b. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons *J. Neurosci.* (8): 2394-2405.
- Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., Jaenisch, R., 1995. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* (375): 238-241.
- Liu, R. Y., Snider, W.D., 2001. Different signalling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J. Neurosci.* (21): RC164
- Lu, B., Pang, P. T., Woo, N. H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* (6): 603-614.
- Lu, X., Richardson, P. M., 1991. Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. *J. Neurosci.* (11): 972-978.
- Ma, Y. T., Hsieh, T., Forbes, M. E., Johnson, J. E., Frost, D. O., 1988. BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J. Neurosci.* (18): 2097-2107.
- Mahoney, S. A. Hosking, R., Farrant, S., Holmes, F. E., Jacoby, A. S., Shine, J., 2003. The second galanin receptor GALR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *J. Neurosci.* (23): 416-421.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., Yancopoulos, G. D., 1990. Neurotrophin-3 : a neurotrophic factor related NGF and BDNF. *Science* (247): 1446-1451.

- Manfridi, A., Forloni, G. L., Arrigoni-Martelli, E., Mancina, M., 1992. Culture of dorsal root ganglion neurons from aged rats: effects of acetyl-L-carnitine and NGF. *Int. J. Dev. Neurosci.* (10): 321-329.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtman, B., Sendtner, M., Brem, G., Thoenen, H., 1993. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*. (365): 27-32.
- Matheson, C. R., Carnahan, J., Urich, J. L., Bocangel, D., Zhang, T. J., Yan, Q., 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J. Neurobiol.* (32): 22-32.
- McGregor, G. P., Gibson, S. J., Sabate, I. M., Blank, M. A., Christofides, N. D., Wall, P. D., Polak, J. M., Bloom, S. R., 1984. Effect of peripheral nerve section and nerve crush on spinal cord neuropeptides in rat; increased VIP and PHI in dorsal horn. *Neuroscience*. (13): 207-216.
- McKeon, R. J., Hoke, A., Silver, J., 1995. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* (136): 32-43.
- McMahon, S. B., 1996. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (351): 431-440.
- McMahon, S. B., Armanini, M. P., Ling, L. H., Philips, H. S., 1994. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* (12): 1161-1171.
- McQuarrie, I. G., 1978. The effect of conditioning lesions on regeneration of motor axons, *Brain Res*, (152):597-602.
- McQuarrie, I. G., 1985. Effect of conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of ranvier. *J. Comp. Neurol.* (231): 239-249.
- McQuarrie, I. G., Grafstein, B., 1981. Effect of a conditioning lesion on optic nerve regeneration in goldfish. *Brain Res*. (216): 253-264.
- McQuarrie, I. G., Grafstein, B., 1982. Protein synthesis and axonal transport in gold fish retinal ganglion cells during regeneration accelerated by a conditioning lesion. *Brain Res*. (251): 25-37.

- Memberg, S. P., Hall, A. K., 1995. Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. *Mol. Cel. Neurosci.* (6): 323-335.
- Merlio, J. P., Ernfors, P., Jaber, M., Persson, H., 1992. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neurosci.* (51): 513-532.
- Michael, G. J., Averill, S., Nitkunan, A., Rattray, M., Bennett, D. L., Yan, Q., Priestley, J. V., 1997. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J. Neurosci.* (17): 8476-8490.
- Molliver, D. C., Wright, D. E., Leitner, M. L., Parsadanian, A. S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., Snider, W. D., 1997. IB4-binding nociceptors switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* (19): 849-861.
- Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Philips, H. S., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K., Rosenthal, A., 1996. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* (382): 76-79.
- Mu, X., Silos - Santiago, I., Carroll, S., Snider, W., 1993. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* (13): 4029-4041.
- Mulderry, P. K., 1994. Neuropeptide expression by newborn and adult sensory neurons in culture effects of nerve growth factor and other neurotrophic factors. *Neurosci.* (59): 673-688.
- Murphy, P.G., Ramer, M.S., Bortwick, L., Gauldie, J., Richarson, P.M., Bisby, M.A., 1999. Endogenous IL-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with choronic nerve constriction in mice. *Eur. J. Neurosci.* (11): 2243-2253.
- Navarro, X., Vivo, M., Valero-Cabre, A., 2007. Neural Plasticity after periferal nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology.* (4): 163-201
- Navarro, X., Kennedy, W. R., 1990. The effect of a conditioning lesion on sudomotor axon regeneration. *Brain Res.* (251): 25-37.

- Neuberger, T. J., De Vries, G. H., 1993. Distribution of fibroblast growth factor in cultured dorsal root ganglion neurons and Schwann cells: localization during maturation in vitro. *J. Neurocytol.* (22): 436-448.
- Neumann, S., Woolf, C. J., 1999. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron.* (23): 83-91.
- Ng, Y. P., He, W., Ip, N. Y., 2003. Leukemia inhibitory factor receptor signaling negatively modulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells and sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 278(40): 38731-9.
- Nielsen, V., Bisby, M. A., Keen, P., 1987. Effect of cutting or crushing the rat sciatic nerve on synthesis of substance P by isolated L5 DRG. *Neuropeptides.* (10): 137-145.
- Noguchi, K., Kawai, Y., Fukuoka, T., Senba, E., Miki, K., 1995. Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *J. Neurosci.* (15): 7633-7643.
- Noguchi, K., Senba, E., Morita, Y., Sato, M., Tohyama, M., 1990. Alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs are differentially regulated in the rat spinal cord and DRG. *Mol. Brain Res.* (7): 299-304.
- Oblinger, M., M., Lasek, R., 1984. A conditioning lesion of the peripheral axons of dorsal root ganglion cells accelerates regeneration of only their peripheral axons. *The Journal of Neuroscience.* (7): 1736-1744.
- O'Brien, J. J., Nathanson N. M., 2007. Retrograde activation of STAT3 by leukemia inhibitory factor in sympathetic neurons. *J Neurochem* 103(1): 288-302.
- Oellig, C., Pirvola, U., Taylor, L., Elde, R., Hökfelt, T., Pettersson, R. F., 1995. Acidic FGF and FGF receptors are specifically expressed in neurons of developing and adult rat dorsal root ganglia. *Eur. J. Neurosci.* (7): 863-874.
- Ohara, S., Roth, K. A., Beaudet, L. N., Schmidt, R. E., 1994. Transganglionic neuropeptide Y response to sciatic nerve in rats. *Exp. Neurol.* (53): 646-662.
- Otten, U., Goedert, M., Moyer, N., Lembeck, F., 1980. Requirement of nerve growth factor for development of substance P containing sensory neurons. *Nature* (287): 158-159.

- Otto, D., Unsicker, K., Grothe, C., 1987. Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* (83): 156-160.
- Öztürk, G. Erdoğan, E., 2004. Multidimensional long-term time lapse microscopy of in vitro peripheral nerve regeneration. *Microscopy Research and Technique.* (64):228-242.
- Öztürk, G., 1999. *Axonal regeneration and expression of neuropeptides and neurofilaments in primary sensory neurons in vitro*. Doktora tezi. King's Collage London. 177.
- Öztürk, G., Tonge, D.A., 2001. Effects of Leukemia Inhibitory Factor on galanin expression and on axonal growth in adult dorsal root ganglion neurons in vitro. *Experimental Neurology.* (169): 376-385.
- Palkovits, M., 1995. Neuropeptid Messenger plasticity in the CNS neurons following axotomy. *Mol. Neurobiol.* (10): 91-103.
- Park, C. M., Hollenberg, M. J., 1993. Growth factor induced retinal regeneration in vivo. *Int. Rev. Cytol.* (146) 49-74.
- Peinado-Ramón, P., Salvador, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (37): 489-500.
- Perry, G. W., Kryanek, S. R., Wilson, D. L., 1983. Protein synthesis and fast axonal transport during regeneration of dorsal roots. *J. Neurochem.* (40): 1590-1598.
- Perry, G. W., Kryanek, S. R., Wilson, D. L., 1987. Effects of a conditioning lesion on bullfrog sciatic nerve regeneration: analysis of fast axonal transported proteins. *Brain Res.* (423): 1-12.
- Pincus, D. W., DiCicco-Bloom, E. M., Black, I. B. 1990., Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature.* (343): 564-567.
- Poo, M. M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* (2): 24-32.

- Qui, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P. N., Bregman, B. S., 2002. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*. (34): 895-903.
- Qui, J., Cafferty, W. B., McMahon, S. B., Thompson, S. W., 2005. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J. Neurosci*. (25): 1645-1653.
- Rao, M. S., Sun, Y., Vaidyanathan, U., Landis, S. C., Zigmond, R. E., 1993. Regulation of substance P is similar to that of vasoactive intestinal peptide after axotomy or explantation of the rat superior cervical ganglion. *J. Neurobiol*. (24): 571-580.
- Redshaw, J. D., Bisby, M. A., 1987. Proteins of fast axonal transport in regenerating rat sciatic sensory axons: a conditioning lesion does not amplify the characteristic response to axotomy. *Exp. Neurol*. (98): 212-221.
- Reich, J. B., Burmeister, D. W. Schmidt, J. T., Grafstein, B., 1990. Effect of conditioning lesions on regeneration of goldfish optic axons: time course of the cell body reaction to axotomy. *Brain Res*. (515): 256-260.
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil. Trans. R. Soc*. (361): 1545-1564.
- Rende, M., Muir, D., Ruoslahti, E., Hagg, T., Varon, S., Manthorpe, M., 1992. Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* (5): 25-32.
- Rich, K. M., Luszczynski, J. R., Osborne, P. A., Johnson, E. M. Jr., 1987. Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J. Neurocytol*. (16): 261-268.
- Rich, K. M., Yip, H. K., Osborne, P. A., Schmidt, R. E., Johnson, E. M., Jr., 1984. Role of nerve growth factor in the adult dorsal root ganglia neuron and its response to injury. *J. Comp. Neurol*. (230): 110-118.
- Rifkin, D. B., Moscatelli, D., 1989. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol*. (109) 1-6.
- Sachs, H. H., Wynick, D., Zigmond, R. E., 2007. Galanin plays a role in the conditioning lesion effect in sensory neurons. *Neuroreports*. (18): 1729-1733.

- Schechterson, L. C., Bothwell, M., 1992. Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* (9): 449-463.
- Scherer, S. S., Salzer, J. L., 1996. *Axon-schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. In Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance.* Oxford: Bios Scientific Publishers. 165-185.
- Schwartz, J. P., Pearson, J., Johnson, E. M., Jr., 1982. Effect of exposure to anti-NGF on sensory neurons of adult rats and guinea pigs. *Brain Res.* (244): 378-381.
- Shelton, D. L., Reichardt, L. F., 1984. Expression of the beta-nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation of effector organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (81): 7951-7955.
- Shoemaker, S. E., Sachs, H. H., Vaccariello, S. A., Zigmond, R. E., 2006. Reduction in nerve growth factor availability leads to a conditioning lesion-like effect in sympathetic neurons *Journal of Neurobiology.* (66): 1322-1337.
- Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Ozaki, S., Smeyne, R. J., Fagan, A. M., Barbacid, M., Snider, W. D., 1995. Non-TrkA expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J. Neurosci.* (15): 5929-5942.
- Sjöberg, J., Kanje, M., 1990a. The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of local environment for conditioning lesion effect. *Brain Res.* (529): 79-84.
- Sjöberg, J., Kanje, M., 1990b. Effects of repetitive conditioning crush lesion on regeneration of the rat sciatic nerve, *Brain Res.* (530):167-169
- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., Barbacid, M., 1994. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* (368): 246-249.
- Stanke, M., Duong, C. V., Pape, M., Geissen, M., Burbach, G., Deller, T., Gascan, H., Parlato, R., Schütz, G., Rohrer, H., 2006. Target dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp 130 signalling. *Development.* (133): 141-150.

- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., Abbondanzo, S. J., 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* (359): 76-79.
- Sun, Y., Zigmond, R. E., 1996. Leukemia Inhibitory Factor induced in the sciatic nerve after axotomy is involved in the induction of galanin in sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* (8): 2213-2220.
- Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Ito, D., Dembo, T., Kosakai, A., Fukuuchi, Y., 2000. Immunohistochemical detection of LIF after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (20): 661-668.
- Suzuki, S., Yamashita, T., Tanaka, K., Hattori, H., Sawamoto, K., Okano, H., Suzuki, N., 2005. Activation of cytokine signalling through LIF receptor/gp 130 attenuates ischemic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (25): 685-693.
- Tanaka, K., Zhang, Q. L., Webster, H. F., 1992. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: Morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditioning lesions, *Exp. Neurol.* (118):53-61.
- Tanaka, S., Koike, T., 1994. Vasoactive intestinal peptide suppresses neuronal cell death induced by nerve growth factor deprivation in rat sympathetic ganglion cells in vitro. *Neuropeptides.* (26): 103-111.
- Tetzlaff, W., Leonard, C., Krekoski, C. A., Parhad, I. M., Bisby, M. A., 1996. Reductions in motoneuronal neurofilament synthesis by successive axotomies: a possible explanation for the conditioning lesion effect on axon regeneration. *Exp. Neurol.* (139): 95-106.
- Tham, S. B., Dowsing, D., Finkelstein, D., Donato, R., Cheema, S. S., Bartlett, P. F., Morrison, W. A., 1997. LIF enhances the regeneration of transected rat sciatic nerve and the function of reinnervated muscle. *J. Neurosci. Res.* (47): 208-215.
- Thoenen, H., Sendtner, M., 2002. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.* (5): 1046.
- Thompson, S. W., Priestly, J. V., Southall, A., 1998. Gp 130 cytokines LIF and IL-6 induce neuropeptide expression in intact adult rat sensory neurons in vivo:

- Time course, specificity and comparison with sciatic nerve axotomy. *Neuroscience*. (84): 1247-1255.
- Thompson, S. W., Vernallis, A. B., Heath, J. K., Priestly, J. V., 1997. LIF is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers. *Eur. J. Neurosci.* (9): 1244-1251.
- Torigoe, K., Hashimoto, K., Lundborg, G., 1999. A role of migratory schwann cells in a conditioning effect of peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*. (160):99-108.
- Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Phillips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, N., Takahashi, M., Vandle, R., Henderson, C. E., Rosenthal, A., 1996. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* (382): 80-83.
- Trupp M., Rydén M., Jörnvall H., Funakoshi H., Timmusk T., Arenas E. Ibanéz C.F., 1995 Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* (130): 137-148.
- Varon, S., Manthorpe, M., Adler, R., 1979. Cholinergic neurotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* (173): 29-45.
- Vejsada, R., Tseng, J. L., Lindsay, R. M., Acheson, A., Aebischer, P., Kato, A. C., 1988. Synergistic but transient rescue effects of BDNF and GDNF on axotomized neonatal motoneurons. *Neurosci.* (84): 129-139.
- Villar, M. J., Wiesenfelt-Hallin, Z., Xu, X. J., Theodorsson, E., Emson, P. C., Hökfelt, T., 1991. Further studies on galanin, substance P, CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions. *Exp. Neurol.* (112): 29-39.
- Wakisaka, S., Kajander, K. C., Bennett, G. J., 1991. Increased neuropeptide (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.* (124): 200-203.

- Wallicke, P. A., 1988. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J. Neurosci.* (8): 2618-2627.
- Wallicke, P. A., Cowan, W. M., Ueno, N., Baird, A., Guillemin, R., 1986. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (83): 3012-3016.
- Wetmore, C., Ernfors, P., Persso, H., Olson, L., 1990. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp. Neurol.* (109): 141-152.
- Wiederberg, A., Lundborg, G., Dahlin, L. B., 2001. Nerve regeneration enhancement by tourniquet. *Journal of Hand Surgery.* (4): 347-351.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., 1998. Galanin in somatosensory function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (863): 383-389.
- Yip, H. K., Rich, K. M., Lampe, P. A., Johnson, E. M. Jr., 1984. The effects of nerve growth factor and its antiserum on the postnatal development and survival after injury of sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* (4): 2986-2992.
- Zhang, L., Palmer, R., McClellan, A. D., 2004. Conditioning lesion enhance axonal regeneration of descending brain neurons in spinal-cord-transected larval lamprey. *The Journal of Comparative Neurology.* (478): 395-404.
- Zhang, X., Xu, Z. O., Shi, T. J., Landry, M., Holmberg, K., Ju, G., Tong, Y. G., Bao, L., Cheng, X. P., Wiesenfeld-Hallin, Z., Lozano, A., Dostrovsky, J., Hökfelt, T., 1998. Regulation of expression of galanin and galanin receptors in DRG and spinal cord after axotomy and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (863): 402-413.
- Zheng, J. L., Stewart, R. R., Gao, W. Q., 1995. Neurotrophin-4/5 enhances survival of cultured spiral ganglion neurons and protects them from cisplatin neurotoxicity. *J. Neurosci.* (15): 5079-5087.
- Zigmond, R. E., Hyatt-Sachs, H., Mohney, R. P., Schreiber, R. C., Shadiack, A. M., Sun, Y., Vaccariello, S. A., 1996. Changes in neuropeptide phenotype after axotomy of adult peripheral neurons and the role of leukemia inhibitory factor. *Perspec. Dev. Neurobiol.* (4): 75-90.

Zigmond, R. E., Sun, Y., 1997. Regulation of neuropeptide expression in sympathetic neurons. Paracrin and retrograd influences. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (814): 181-197.

ÖZGEÇMİŞ

Elif KAVAL OĞUZ, 1976 yılında Van'da doğdu. İlköğrenimini Van'da tamamladı. Lise öğrenimini Van Gölü Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1995 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2002 yılında bu eğitimini tamamlayarak 2003 yılında da doktora öğrenimine başladı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nde Uzman olarak çalışmakta olup; evli ve bir çocuk annesidir.